



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Professur für Biotechnologie der Naturstoffe

FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER FRA A 1 GENFAMILIE IN DER ERDBEERE

Katrin Anna Helga Franz-Oberdorf

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ralph Hückelhoven

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Wilfried Schwab

2. apl. Prof. Dr. Bernadette Eberlein

3. Prof. Dr. Margit Laimer

Die Dissertation wurde am 23.09.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 30.01.2020 angenommen.

**Die Frage ist weniger, ob Pflanzen intelligent sind, als vielmehr,
ob wir intelligent genug sind, sie zu verstehen.**

Ian Baldwin (* 1958)

Meiner ganzen Familie

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Wilfried Schwab gilt mein ganz besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit an der Professur „Biotechnologie der Naturstoffe“ zu promovieren. Ich danke ihm für das angenehme, inspirierende und freie Arbeitsumfeld, die vielen konstruktiven und begeisternden Diskussionen, Anregungen und seine fortwährende Unterstützung.

Prof. Dr. Brigitte Poppenberger danke ich für die wissenschaftliche und gartenbauliche Unterstützung, die vielen hilfreichen Tipps und die Bereitstellung des Platzes im Gewächshaus für *Arabidopsis thaliana* *atap* T-DNA knock-out Mutanten.

Prof. Dr. Bernadette Eberlein danke ich herzlich für die Möglichkeit und die wissenschaftliche Unterstützung zur Durchführung der BAT Analysen. Ich danke ihr für die Organisation der Probanden, die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Geräte und die kritische Durchsicht der daraus resultierenden Veröffentlichungen. Ich danke auch Franziska Martin (Lehrstuhl für Dermatologie und Allergie, Klinikum rechts der Isar, Biederstein, TU München) für ihre Hilfe in technischen Belangen und Tipps in Zusammenhang mit dem Flow CAST[®] Kit, dem FACScan Durchflusszytometer und der CellQuest[™] Software. Des Weiteren danke ich Ina Rondak (Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie, TU München) für ihre hilfreichen Tipps und Expertise bei der Planung der Experimente und der Wahl der aussagekräftigsten statistischen Tests.

Außerdem gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Brigitte Poppenberger, Frau Prof. Dr. Bernadette Eberlein, Herrn Prof. Dr. Ralph Hückelhoven und Prof. Dr. Wilfried Schwab für die Mitarbeit in der Prüfungskommission.

Des Weiteren danke ich allen Kollaborationspartnern, insbesondere Dr. José Márquez, Dr. Ulrich Zander (EMBL, Grenoble Frankreich), Dr. Ana Casañal und Prof. Dr. Victoriano Valpuesta (Universität Málaga, Spanien) für den intensiven wissenschaftlichen Austausch und die anregenden und motivierenden Diskussionen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Victoriano Valpuesta für die Möglichkeit bedanken, dass ich meine Interaktionsstudien und *in vitro* Komplementationsversuche am Department für Molekularbiologie und Biochemie der Universität Málaga durchführen durfte. Ich danke dem ganzen Arbeitskreis, insbesondere Dr. Ana Casañal und meiner Mitbewohnerin Spiridoula für die herzliche Aufnahme, die Unterstützung und Einarbeitung im Labor und die zahlreichen großartigen Ausflüge.

Ein weiterer Dank gilt den Gründern und Mitarbeitern von Dynamic Biosensors GmbH Dr. Ulrich Rant, Dr. Ralf Strasser und Dr. Andreas Langer für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Interaktionsstudien.

Ich danke allen Mitgliedern des Sonderforschungsbereiches 924 (SFB924) für den stehenden Austausch wissenschaftlicher Resultate, Ideen und Methoden. Dankend hervorheben möchte ich an dieser Stelle Prof. Dr. Claus Schwechheimer, Dr. Erika Isono, Dr. Inês Barbosa, Dr. Cornelia Kolb und Dr. Quirin L. Ranftl vom Lehrstuhl „Systembiologie der Pflanzen“ (TUM), Prof. Dr. Erwin Grill und Dr. Christian Wunschel vom Lehrstuhl „Botanik“ (TUM) und Prof. Dr. Bernhard Küster und Dr. Dominic Helm vom Lehrstuhl „Proteomics und Bioanalytics“. Ich danke der DFG und TUM für die finanzielle Unterstützung. Mein ganz besonderer Dank gilt den Mitarbeitern und meinen Kollegen aus der Professur „Biotechnologie der Naturstoffe“.

Ich danke Dr. Thomas Hoffmann für die geduldige und gewissenhafte Einarbeitung in molekularbiologische Versuche, in die analytischen und präparativen Analysen mittels LCMS und die zahlreichen motivierenden Diskussionen.

Bei Dr. Stefanie Hücherig und Dr. Fong-Chin Huang bedanke ich mich für die geduldige und präzise Einarbeitung in molekularbiologische Arbeiten.

Ich danke auch Dr. Fatma Besbes herzlich für die Bereitstellung der Klone der fünf Isoformen Fra a 1.04 bis Fra a 1.08, welche sie im Zuge ihrer Dissertation hergestellt und untersucht hat.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der Professur „Biotechnologie der Naturstoffe“ danke ich herzlich für das angenehme Arbeitsklima und die stehende Hilfsbereitschaft. Im Speziellen danke ich Dr. Ruth Habegger, Dr. Fong-Chin Huang und PD Dr. Thilo Fischer, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Ganz besonders danke ich Dr. Su-Ying Yeh, Dr. Doreen Schiller, Dr. Friedericke Bönisch und Dr. Katja Härtl für die hervorragende Atmosphäre im Büro und eure Freundschaft!

Für das Interesse an dem Thema und die engagierte Arbeit an Forschungspraktika, Bachelorarbeiten und Masterarbeiten danke ich den Studenten Sarah Fischer, Julia Martin, Annika Volmari, Walter Philip Bleicher, Lisa Kranzberger, Eva Dollinger, Lisa Valentina Kretz, Samed Güner, Katharina Koller, Robert Hartig, Thomas Müller, Melanie Julia Baudrexl und Sophia Weisensee. Mein besonderer Dank für die außerordentliche und engagierte Arbeit während des Forschungspraktikums und der Masterarbeit gilt Kathrin Edlmann.

Nicht zuletzt und mein größter Dank gebührt meinen Eltern, da sie mir das Studium und die Promotion überhaupt ermöglicht haben, mich stets unterstützt und ermutigt haben. Ich danke euch von ganzem Herzen! Auch meiner Schwester, meinem Bruder, meinen Großeltern und meinen Schwiegereltern danke ich sehr herzlich für aufbauende und unterstützende Worte und Taten. Zuletzt danke ich meinem Ehemann Christian von Herzen für seine unendliche Geduld, seine motivierenden Worte und den starken Rückhalt!

Ich danke euch für euer Vertrauen und eure uneingeschränkte Unterstützung!

Publikationen

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum September 2011 bis Juni 2015 an der Professur „Biotechnologie der Naturstoffe“ am Wissenschaftszentrum Weihenstephan an der Technischen Universität München durchgeführt. Die Dissertation entstand im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 924 „Molecular mechanisms regulating yield and yield stability in plants“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG). Auszüge aus dieser Dissertation wurden bereits zur Veröffentlichung eingereicht bzw. veröffentlicht.

Originalartikel

Erstautorschaft

Franz K, Eberlein B, Hücherig S, Edelmann K, Besbes F, Ring J, Darsow U, Schwab W. Breeding of hypoallergenic strawberry fruit. *Journal of Berry Research*. 2013; 3:197-201.

Franz-Oberdorf K, Eberlein B, Edelmann K, Hücherig S, Besbes F, Darsow U, Ring J, Schwab W. Fra a 1.02 is the most potent isoform of the Bet v 1-like allergen in strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016; 64:3688-3696.

Franz-Oberdorf K, Eberlein B, Edelmann K, Bleicher P, Kurze E, Helm D, Olbricht K, Darsow U, Ring J, Schwab W. White-fruited strawberry genotypes are not per se hypoallergenic. *Food Research International*. 2017; 100:748-756.

Franz-Oberdorf K, Langer A, Strasser R, Isono E, Ranftl Q L, Wunschel C, Schwab W. Physical interaction between the strawberry allergen Fra a 1 and an associated partner FaAP. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2017; 85:1891–1901.

Co-Autorschaft

Wittek F, Kanawati B, Wenig M, Hoffmann T, Franz-Oberdorf K, Schwab W, Schmitt-Kopplin P, Volt, C. Folic acid induces salicylic acid-dependent immunity in Arabidopsis and enhances susceptibility to *Alternaria brassicicola*. *Molecular Plant Pathology*. 2014; 16:616-622.

Song C, Hong X, Zhao S, Liu J, Schulenburg K, Huang F, Franz-Oberdorf K, Schwab W. Glucosylation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, the key strawberry flavour compound in strawberry fruit. *Plant Physiology*. 2016; 171:139-151.

Härtl K, Denton A, Franz-Oberdorf K, Hoffmann T, Spornraft M, Usadel B, Schwab W. Early metabolic and transcriptional variations in fruit of natural white-fruited *Fragaria vesca* genotypes. *Scientific Reports*. 2017; 7:45113.

Härtl K, Huang F-C, Giri A P, Franz-Oberdorf K, Frotscher J, Shao Y, Hoffmann T, Schwab W. Glucosylation of smoke-derived volatiles in grapevine (*Vitis vinifera*) is catalyzed by a promiscuous resveratrol/guaiacol glucosyltransferase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017; 65:5681-5689.

Besbes F, Franz-Oberdorf K, Schwab W. Phosphorylation-dependent ribonuclease activity of Fra a 1 proteins. *Journal of Plant physiology*. 2019; 233:1-11.

Joshi R, Trinkl J, Haugeneder A, Härtl K, Franz-Oberdorf K, Giri A, Hoffmann T, Schwab, W. Semi-rational design and engineering of grapevine glucosyltransferases for enhanced activity and modified product selectivity. *Glycobiology*. 2019; cwz056, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz056>.

Vorträge

Franz K, Schwab W (2012) Functional characterization of the Fra a gene family of strawberry (*Fragaria ×ananassa*) (Stand 2012). Tagung der Sektion Pflanzliche Naturstoffe der deutschen Botanischen Gesellschaft (DBG), Hildesheim.

Franz K, Hücherig S, Darsow U, Schwab W, Eberlein B (2012) Basophilen-Aktivierung durch die Erdbeerallergene bei Patienten mit Birkenpollenallergie (Stand 2012). 7. Deutscher Allergiekongress 2012, Garching.

Franz K, Hücherig S, Darsow U, Schwab W, Eberlein B (2013) Basophilen-Aktivierung durch die Erdbeerallergene bei Patienten mit Birkenpollenallergie (Stand 2013). 64. Arbeitstagung des

Regionalverbandes Bayern der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Fachgruppe in der GDCh, Oberschleißheim.

Franz K, Strasser R, Schwab W (2013) Protein-Protein interaction analysis by time-resolved measurements with an electro-switchable DNA chip (Stand 2013). SFB 924 progress meeting, München.

Posterpräsentationen

Franz K, Hoffmann T, Schwab W (2013) Erdbeerqualität: Aromastoffe und Allergene. München.

Franz K, Strasser R, Kranzberger L, Schwab W (2013) Validation of FaAP as interacting Partner of Fra a proteins (Stand 2013). SFB 924 conference, Freising.

Franz K, Schwab W (2013) Functional characterization of the Fra a gene family of strawberry (Stand 2013). Deutsche Botanikertagung, Tübingen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis V

Abkürzungen X

Zusammenfassung..... XIII

Summary XV

I Einleitung..... 1

1. Die Erdbeere..... 1

1.1 Wirtschaftliche Bedeutung..... 1

1.2 Geschichte und Entwicklung 2

1.2.1 *Fragaria vesca* 3

1.2.2 *Fragaria xananassa* 4

1.2.3 *Fragaria nilgerrensis*..... 4

1.3 Morphologie, Fruchtentwicklung, Inhaltsstoffe und positive gesundheitliche Effekte 5

1.4 Flavonoidbiosyntheseweg..... 7

2. Allergie – Nahrungsmittelallergie..... 8

2.1 Type-I-Allergie 9

2.2 Pathogenesis-related Proteinfamilie 10..... 10

2.3 Kreuzreaktivität am Beispiel der Birkenpollenallergie 11

2.4 Untersuchte PR-10 Proteine und FaAP 12

2.4.1 Haupt-Birkenpollenallergen Bet v 1 12

2.4.2 Haupt-Erdbeerallergen Fra a 1 13

2.4.3 Fra a 1-Assoziiertes Protein (FaAP) 17

2.5 Natürlich vorkommende weiß-fruchtige Genotypen 17

3. Verwendete Methoden 18

3.1 Allergen-induzierter Basophilen Aktivierungstest..... 18

3.2 Protein-Protein Interaktionsstudie: Hefe Zwei-Hybrid Analyse (Y2H) 19

3.3 Protein-Protein Interaktionsstudie: „Time-resolved DNA switching“ Analyse 19

4. Aufgabenstellung..... 20

II Material und Methoden 22

1. Material 22

1.1 Pflanzenmaterial 22

1.1.1 Erdbeerarten 22

1.2 Heterologe Proteinexpression..... 25

1.3 Testpersonen und Kontrollgruppen 26

1.4	Chemikalien	28
1.5	Bakterien- und Hefestämme	28
1.6	Vektoren	29
1.7	Antibiotika	30
1.8	Primer für Klonierung und Sequenzierung.....	30
1.8.1	Oligonukleotidprimer für Sequenzierungen.....	31
1.8.2	Primer für die Synthese von cDNA: Oligo(dT) ₁₅ Primer	31
1.8.3	Oligonukleotidprimer	31
1.8.4	Oligonukleotidprimer für die relative Genexpressionsanalyse.....	33
1.9	Enzyme und weitere verwendete Substanzen	33
1.10	Medien, Puffer und Lösungen	34
1.10.1	Medien	34
1.10.2	Puffer	35
1.10.3	Lösungen	37
1.11	Kommerzielle Kits	39
1.12	DNA und Proteinmarker	39
1.13	Antikörper	40
2.	Software und Internet-Ressourcen	40
3.	Geräte und Verbrauchsmateriel.....	41
3.1	Geräte.....	41
3.2	Verbrauchsmaterial.....	42
4.	Methoden.....	43
4.1	Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden	43
4.1.1	Extraktion von Gesamt-RNA.....	43
4.1.2	Entfernung von kopräzipitierter genomischer DNA	44
4.1.3	Erst-Strang-cDNA Synthese (reverse Transkription)	44
4.1.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	44
4.1.5	Agarosegelelektrophorese	45
4.1.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel.....	45
4.1.7	Restriktion von DNA mittels Endonukleasen.....	46
4.1.8	Ligationsreaktion	46
4.1.9	Herstellung von chemo-kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	47
4.1.10	Herstellung und Transformation von chemo-kompetenten <i>S. cerevisiae</i> Zellen.....	47
4.1.11	Hitzeschock Transformation von chemo-kompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	47
4.1.12	Sequenzierung von DNA.....	48

4.1.13	Isolation von Plasmid-DNA und Herstellung von Glycerin Dauerkulturen	48
4.1.14	Kultivierung und Expression von rekombinanten Proteinen	48
4.1.15	Proteinisolation aus <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS Zellen	48
4.1.16	Aufreinigung des His-tag fusionierten Proteins mittels Affinitätschromatographie.	48
4.1.17	Regeneration des Profinity™ IMAC Ni-charged Resins	49
4.1.18	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	49
4.1.19	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
4.1.20	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
4.1.21	Coomassie Färbung von Polyacrylamidgelen	50
4.1.22	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	50
4.1.23	Sequenzierung von Proteinbanden	51
4.1.24	Quantifizierung und Identifizierung von Peptiden und Proteinen	51
4.1.25	Fra a 1.02-spezifischer polyklonaler Antikörper	51
4.1.26	Western Blot Analyse	52
4.1.27	Allergen-induzierter Basophilen Aktivierungstest (BAT)	52
4.1.27.a	Zellsortierung mittels Fluoreszenz (FACS): Allgemein	52
4.1.27.b	Untersuchungsmaterial: rekombinante Proteine	53
4.1.27.c	Untersuchungsmaterial: phenolischer Extrakt der Erdbeergenotypen	53
4.1.27.d	Basophilen Aktivierungstest	53
4.1.28	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	54
4.1.29	Analyse der Protein-Protein-Wechselwirkungen	55
4.1.29.a	Hefe Zwei-Hybrid (Y2H)	55
4.1.29.b	„Time-resolved DNA switching“ Analyse	56
4.2	Methoden mit pflanzlichem Material	57
4.2.1	Phenolischer Proteinextrakt aus Erdbeerfrüchten	57
4.2.2	Immuno-Tissue-Print (ITP)	57
4.3	Statistische Analyse und Boxplots	58
III	Ergebnisse	59
1.	Auswahl der Fra a 1 Isoformen	59
1.1	Einordnung der 21 Fra a 1 Isoformen in die PR-10 Proteinfamilie	59
1.2	Auswahl der Fra a 1 Proteine	60
1.3	<i>In silico</i> Analyse der acht Fra a 1 Proteinsequenzen	61
2.	Basophilen Aktivierungstest	61
2.1	Klinische und biologische Charakterisierung der atopischen und nicht-atopischen Probanden	61

2.2	Validierung des Basophilen Aktivierungstests für rekombinante Proteine	62
2.3	Validierung des Basophilen Aktivierungstests für phenolische Erdbeerextrakte	64
2.4	Basophiler Aktivierungstest der acht rekombinanten Fra a 1 Proteine	66
2.5	Verifizierung des Haupt-Erdbeerallergens mittels einer qRT-PCR Analyse.....	68
2.6	Identifizierung von möglichen hypoallergenen Erdbeergenotypen	69
2.7	Basophilen Aktivierungstest von phenolischen Proteinextrakten	71
2.8	Immuno-Tissue-Print (ITP).....	72
3.	Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen den Fra a 1 Isoformen und FaAP.....	73
3.1	<i>In silico</i> Analyse der Sequenz von FaAP.....	73
3.2	<i>In vivo</i> Interaktionsstudie zwischen Fra a 1.01E/1.02/1.03 und FaAP mittels Hefe Zwei-Hybrid	74
3.3	<i>In vitro</i> Interaktionsstudie zwischen Fra a 1.01E/1.02/1.03 und FaAP mittels „time-resolved DNA switching“	75
IV	Diskussion.....	82
1.	Basophilen Aktivierungstest.....	82
1.1	Einordnung des Erdbeerallergens Fra a 1	82
1.2	Allergenes Potential der acht Fra a 1 Isoformen.....	82
1.3	Identifikation des Haupt-Erdbeerallergens	83
1.4	Allergenes Potential der verschiedenen Erdbeergenotypen	84
1.5	Analyse der relativen Genexpression der <i>Fra a 1</i> Gene in den Erdbeergenotypen.....	85
1.6	Genmutationen bezüglich der Farbe einer reifen Erdbeerfrucht	85
2.	Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Fra a 1 und FaAP	86
2.1	<i>In vivo</i> Interaktionsanalyse mittels des Hefe Zwei-Hybrid Systems.....	86
2.2	<i>In vitro</i> Interaktionsanalyse mittels des „time-resolved DNA switching“ Systems.....	86
2.3	Konzentrationsabhängige und FaAP-unabhängige Dimerisierung von Fra a 1.01E.....	86
2.4	Fra a 1 Isoformen als Transporter für Metabolite – eine Hypothese.....	87
2.5	Positivkontrollen: Interaktion zwischen RCAR8 und ABI2 auch ABA-unabhängig	88
2.6	Mögliche Funktion des Komplexes Fra a 1-FaAP in der Autophagie durch eine weitere Interaktion mit dem Protein ATG8.....	88
3.	Schlussfolgerung.....	89
V	Anhang	91
1.	Kodierende Sequenzen.....	91
1.1	Nukleotidsequenz von Fra a 1.01E (Akzessionsnummer: AM236319)	91
1.2	Nukleotidsequenz von Fra a 1.02 (Akzessionsnummer: GQ148818).....	91
1.3	Nukleotidsequenz von Fra a 1.03 (Akzessionsnummer: GQ148819).....	91

1.4	Nukleotidsequenz von Mal d 1 (Akzessionsnummer: AJ417551)	91
1.5	Nukleotidsequenz von FaAP (Akzessionsnummer: KF785812)	91
1.6	Nukleotidsequenz von MdAP (Akzessionsnummer: AAD21467)	92
1.7	Nukleotidsequenz von eGFP (Akzessionsnummer: KM396758.1)	92
2.	Abbildungen	92
VI	Referenzen	97

Abkürzungen

3-AT	Amino-1, 2, 4-triazol
Å	Angström
ABA	Abscisinsäure
ABI2	<i>abscisic acid insensitive 2</i>
anti-CCR3-PE	monoklonaler Antikörper gegen den menschlichen Chemokinrezeptor 3, markiert mit Phycoerythrin
anti-CD63-FITC	monoklonaler Antikörper gegen den menschlichen <i>cluster of differentiation 63</i> , markiert mit Fluorescein Isothiocyanate
anti-FcεRI	hochspezifischer monoklonaler Antikörper, welcher mit hoher Affinität an den IgE-Bindungsrezeptor bindet
AP	alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen-presenting cell</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
AS/aa	Aminosäure(n)
AUC	relative Fläche unter der Kurve (<i>relative area under the curve</i>)
BAT	Basophilen Aktivierungstest
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bidest. Wasser	bidestilliertes Wasser
BLAST	Suchwerkzeug zum Abgleich biologischer Sequenzen (<i>basic local alignment search tool</i>)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
c	Konzentration (<i>concentration</i>)
CAP	kommerziell erhältlicher Test für die Analyse von spezifischen IgE Antikörpern und deren Konzentration im Serum (Klassen 0-6)
CCR3	Chemokinrezeptor 3
CD63	<i>cluster of differentiation 63</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
C _T	<i>cycle threshold</i>
cv.	Kultivar (<i>cultivated variety</i>)
CV	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>D. farinae</i>	<i>Dermatophagoides farina</i>
DL	Deutschland
DMF	N-N'-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat (N = Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMBL	Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie (<i>European molecular biology laboratory</i>)
F	Rötungshof (Flare)
<i>Fa</i>	<i>Fragaria xananassa</i>
FaAP-eGFP	Fra a 1-Assoziiertes Protein-verbessertes-grün fluoreszierendes Protein (<i>Fra a 1-associated protein-enhanced-green fluorescent protein</i>)
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
fMLP	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin, unspezifischer Zellaktivator
<i>Fn</i>	<i>Fragaria nilgerrensis</i>
Fra a 1	<i>Fragaria xananassa</i> Allergen Klasse 1

Fra a 1.01E – 1.08	<i>Fragaria xananassa</i> Allergen 1.01E – 1.08
Fv	<i>Fragaria vesca</i>
fw	vorwärts (<i>forward</i>)
GAD	Gal4 Aktivierungsdomäne
GDB	Gal4 Bindedomäne
gDNA	genomische DNA (<i>genomic DNA</i>)
GWH	Gewächshaus
GOI	<i>gene of interest</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
His ₆	Poly-Histidin: 6 Histidinreste
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITP	<i>immuno tissue printing</i>
ITO	<i>indium-tin-oxide</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K _D	Dissoziationskonstante (<i>dissociation constant</i>)
k _{on}	Assoziationsrate
k _{off}	Dissoziationsrate
LB	<i>Luria Bertani</i> : Vollmedium zur Anzucht von Bakterien
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry</i> (Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie)
LTP	<i>lipid transfer protein</i>
m	männlich
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMLV-RT	<i>moloney murine leukemia viruse</i> -reverse Transkriptase
mRNA	Boten RNA (<i>messenger RNA</i>)
MG	Molekulargewicht
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	<i>national center for biotechnology information</i>
NES	<i>nuclear export signal</i>
nsLTP-Protein	<i>nonspecific lipid transfer protein</i>
OAS	orales Allergiesyndrom (<i>oral allergy syndrome</i>)
OD _{xx}	Optische Dichte <small>Wellenlänge in nm</small>
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
ori	<i>origin of replication</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR Protein	<i>pathogenesis-related protein</i>
PTGS	Post-transkriptionales Gensilencing
Q3OS	Quercetin 3-O-sophorosid
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RA	<i>rhinoconjunctivitis allergica</i>
RCAR	regulatorische Komponente des ABA-Rezeptors (<i>regulatory component of ABA-receptor</i>)
RCAR8 (PYL5)	regulatorische Komponente des ABA-Rezeptors 8 (Pyrabactin Resistance 1-Like 5; <i>regulatory component of ABA-receptor 8</i>)
RdRP	RNA-abhängige RNA Polymerase (<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>)
rFra a 1.01E-1.08	rekombinantes <i>Fragaria xananassa</i> Allergen 1.01E-1.08

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rv	rückwärts (<i>reverse</i>)
SC	Minimalmedium zur Hefeselektion (<i>synthetic complete medium</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPT	<i>Skin-Prick-Test</i>
Ter	Terminator
T _m	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volumen
w	weiblich
W	Quaddel (Wheal)
WT	Wildtyp
Y2H	<i>Yeast Two-Hybrid</i> (Hefe Zwei-Hybrid)
YPD	Vollmedium zur Hefeanzucht (<i>yeast extract, peptone, dextrose</i>)

Alle verwendeten Maßeinheiten entsprechen den SI-Einheiten.

Die verwendeten Abkürzungen für Aminosäuren und Nukleotide entsprechen den Vorgaben der IUPAC-Nomenklatur.

Abkürzungen von Gensequenzen werden kursiv (z.B. *Fra a 1.02*), die korrespondierenden Proteine in normaler Schreibweise geschrieben (z.B. Fra a 1.02).

Zusammenfassung

Allergene, Proteine, die im menschlichen Körper Allergien und die damit verbundenen vielfältigen und teils schwerwiegenden Symptome auslösen, haben in der Pflanze essenzielle physiologische Funktionen. Ein Beispiel für Nahrungsmittelallergene ist das Erdbeerallergen Fra a 1, welches ein homologes Protein zu dem Haupt-Birkenpollenallergen Bet v 1 und dem Haupt-Apfelallergen Mal d 1 darstellt. Bet v 1, Mal d 1, Fra a 1 und viele weitere Proteine gehören zu der Subfamilie 10 der zytoplasmatisch lokalisierten "Pathogenesis Related Proteins" (PR-10). PR-10 Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Pflanzenabwehr. Sowohl das Haupt-Birkenpollenallergen als auch das Haupt-Apfelallergen stehen seit geraumer Zeit im Fokus der wissenschaftlichen Forschung. Als mögliche pflanzen-physiologische Aufgabe von Bet v 1 wird dabei der Transport von physiologischen Liganden wie Phytosteroide, Lipide und das sekundäre Stoffwechselprodukt Quercetin-3-O-sophorosid diskutiert. Weiterhin konnte mittels eines Yeast Two-Hybrid Assays bereits ein Interaktionspartner für das Haupt-Apfelallergen Mal d 1, das Mal d 1-Assoziierte Protein (MdAP) identifiziert werden. Bei Genomanalysen stellte sich heraus, dass das Bet v 1 homologe Erdbeerallergen Fra a 1 21 Isoformen aufweist (Fra a 1.01E-Fra a 1.21) (Hjernø, Alm et al. 2006, Muñoz, Hoffmann et al. 2010). Expressionsanalysen der 21 Isoformen in unterschiedlichen Pflanzenorganen der Erdbeersorte *Fragaria xananassa* cv. Elsanta mittels qRT-PCR zeigten, dass die Isoformen Fra a 1.01E-1.08 vor allem in der reifen Erdbeerfrucht exprimiert werden. Diese acht Isoformen wiesen eine sehr hohe Aminosäuren-Sequenzähnlichkeit von 82,6% auf. Proteomanalysen und transientes Herabregulieren der drei Fra a 1 Isoformen (Fra a 1.01E/1.02/1.03) in der Frucht von *F. xananassa* cv. Elsanta zeigten, dass Fra a 1 eine wesentliche biologische Funktion während der Pigmentbildung in der Fruchtreife innehat. Patienten, die unter einer Birkenpollenallergie leiden, weisen meist auch eine Kreuzallergie zu Apfel und auch zur Erdbeere auf. Erdbeerfruchtallergiker haben jedoch Früchte eines natürlich vorkommenden weiß-fruchtigen *F. xananassa* Genotyps symptomfrei vertragen, welcher nachweislich einen reduzierten Gehalt an Fra a 1 Proteinen und Enzymen des Anthocyan-Biosyntheseweges enthält. Somit scheint Fra a 1 verantwortlich für die allergische Reaktion gegenüber den Erdbeerfrüchten zu sein.

Ziel dieser Arbeit war es die pflanzen-physiologischen Funktionen der drei Fra a 1 Proteine – Fra a 1.01E, Fra a 1.02 und Fra a 1.03 – weiter zu erforschen. Hierbei sollte das Haupt-Erdbeerallergen unter den acht in der reifen Frucht exprimierten Allergenen Fra a 1.01E-1.08 identifiziert und hypoallergene Erdbeerpflanzen-Genotypen für die Marker-gestützte Züchtung allergenarmer Sorten ermittelt werden. Weiterhin sollte erstmals der Nachweis der Interaktion zwischen FaAP (vermutetes Fra a 1-Assoziierte Protein) und den drei Fra a 1 Proteinen untersucht werden.

Um das Haupt-Erdbeerallergen zu identifizieren wurde das kreuzreaktive allergene Potential der rekombinant vorliegenden potenziellen Erdbeerallergene in einem Basophilen Aktivierungstest (BAT) an Vollblut von Birkenpollenallergikern getestet. Die Aktivierung der Basophilen wurde im Blut von acht atopischen Patienten und zwei nicht-atopischen Probanden in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen der rekombinanten Fra a 1 Isoformen analysiert. Bet v 1a wurde als Positivkontrolle mitgeführt und als Auswahlkriterium der atopischen Patienten eingesetzt. Die Resultate des BAT mit den acht rekombinanten Fra a 1 (1.01E-1.08) Proteinen, welche eine Aminosäuresequenz-Übereinstimmung von 74,5-97,5% mit Fra a 1.02 aufweisen, zeigten deutliche Unterschiede in deren allergenen Potential. Fra a 1.03 und Fra a 1.02 zeigten die höchste Aktivierung der Basophilen. Fra a 1.03 aktivierte 73% und Fra a 1.02 66% aller Basophilen im Vollblut der atopischen Probanden. Da das Gen *Fra a 1.02* eine hohe relative Expression in der reifen Erdbeerfrucht aufwies und *Fra a 1.03* hauptsächlich in der offenen Blüte exprimiert wurde, wurde die Isoform Fra a 1.02 als das Haupt-Erdbeerallergen der Bet v 1 Superfamilie identifiziert.

Für die Suche nach hypoallergenen Erdbeersorten wurde der Western Blot Assay verwendet. Der phenolische Proteinextrakt von 51 natürlich vorkommenden weiß- und rot-fruchtigen Erdbeersorten aus drei verschiedenen Erdbeerarten *F. xananassa*, *F. vesca* und *F. nilgerrensis* wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen Fra a 1.02 untersucht. Nach einer massenspektrometrischen Identifikation von Fra a 1 Isoformen in zwei der isolierten Banden des denaturierenden

Polyacrylamidgeles wurden die Varietäten mit der geringsten Konzentration der Fra a 1 Isoformen für den BAT ausgewählt und analysiert. Von den ursprünglich 51 Erdbeersorten wurden 12 potenzielle hypoallergene Sorten und drei rotfruchtige Kontrollsorten mittels BAT untersucht. Der Mittelwert der aktivierten Basophilen, die durch Extrakte aus natürlich vorkommenden weiß- und rot-fruchtigen Genotypen stimuliert wurden, reichte von 36% bis 84% für weiß-fruchtige Sorten und von 44% bis 76% für rot-fruchtige Genotypen. Diese Daten zeigten deutlich, dass natürlich vorkommende weiß-fruchtige Erdbeersorten nicht per se hypoallergen sind. Der Proteinextrakt aus dem weiß-fruchtigen Genotyp *F. vesca* cv. Yellow Wonder zeigte das geringste allergene Potential mit nur 36% aktivierter Basophilen, aber eine hohe biologische Variabilität.

Die mögliche Interaktion zwischen den drei Erdbeerallergenen Fra a 1.01E/1.02/1.03 und dem putativen FaAP wurde zunächst mittels Yeast Two-Hybrid untersucht. Basierend auf einer hohen Autoaktivierung der C-terminalen Sequenz von FaAP waren die resultierenden Daten nicht schlüssig. Da die Hinweise jedoch vielversprechend waren, wurde ein neues Analysensystem zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt, das „time-resolved DNA switching“ System. Fra a 1.01E, Fra a 1.02 und Fra a 1.03 binden an FaAP mit K_D -Werten von $4,5 \pm 1,1$, 15 ± 3 und 11 ± 2 nM. Fra a 1.01E bildet ein Dimer, während Fra a 1.02 und Fra a 1.03 als Monomer binden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass PR-10 Proteine in ein Protein-Interaktionsnetzwerk integriert sind und die FaAP-Bindung für die physiologische Funktion der Fra a 1-Proteine essenziell ist.

Die vorgestellten Ergebnisse können u.a. einen wertvollen Beitrag zur Lebensmittelsicherheit leisten, wobei die Gene *Fra a 1.02* und *Fra a 1.03* in zukünftigen Züchtungsprogrammen als Marker für die Züchtung von rot-fruchtigen hypoallergenen Erdbeersorten dienen könnten. Weiterhin beweist die erstmals eindeutig gezeigte Interaktion der Fra a 1 Proteine mit einem Protein unbekannter Funktion (FaAP), dass die Erforschung der physiologischen Funktionen der PR-10 Proteine erst am Anfang steht.

Summary

Allergens, proteins, which trigger allergies in the human body and the associated manifold and sometimes severe symptoms, have essential physiological functions in the plant. An example for food allergens is the strawberry allergen Fra a 1, which is a homologous protein to the main birch pollen allergen Bet v 1 and the main apple allergen Mal d 1. Bet v 1, Mal d 1, Fra a 1 and many more proteins belong to subfamily 10 of the cytoplasmically localized "Pathogenesis Related Proteins" (PR-10), which play an important role in plant defence. Both the main birch pollen allergen and the main apple allergen have been the focus of scientific research for some time. The transport of physiological ligands such as phytosteroids, lipids, and the plant secondary metabolite quercetin-3-O-sophoroside is discussed as a possible plant-physiological task of Bet v 1. Furthermore, an interaction partner for the main apple allergen Mal d 1, the Mal d 1-associated Protein (MdAP) could be identified by a Yeast Two-Hybrid Assay. Genome analyses revealed that the Bet v 1 homologous strawberry allergen Fra a 1 has 21 isoforms (Fra a 1.01E-Fra a 1.21). Expression analyses of the 21 isoforms in different plant organs of the strawberry variety *Fragaria xananassa* cv. Elsanta by qRT-PCR showed that the isoforms Fra a 1.01E-1.08 are mainly expressed in the ripe strawberry fruit. These eight isoforms exhibited a very high amino acid sequence similarity of 82.6%. Proteome analyses and transient downregulation of the three Fra a 1 isoforms (Fra a 1.01E/1.02/1.03) in the fruit of *F. xananassa* cv. Elsanta showed that Fra a 1 has an essential biological function in pigment formation during fruit ripening. Patients suffering from birch pollen allergy usually also show a cross allergy to apple and strawberry. However, strawberry fruit allergy sufferers tolerated fruits of a naturally occurring white-fruited *F. xananassa* genotype, which contains a reduced content of Fra a 1 proteins and enzymes of the anthocyanin biosynthesis pathway. Thus, Fra a 1 appears to be responsible for the allergic reaction to strawberry fruits.

The aim of this work was to further investigate the physiological functions of the three Fra a 1 proteins - Fra a 1.01E, Fra a 1.02 and Fra a 1.03. The main strawberry allergen should be identified among the eight allergens Fra a 1 (1.01E-1.08), which are expressed in the ripe fruit and hypoallergenic strawberry plant genotypes for marker-assisted breeding of low allergen varieties should be identified. Furthermore, the interaction between FaAP (suspected Fra a 1-associated protein) and the three Fra a 1 proteins should be investigated for the first time.

To identify the main strawberry allergen, the cross-reactive allergenic potential of recombinant potential strawberry allergens was tested in a basophil activation test (BAT) on whole blood of birch pollen allergic persons. The activation of basophils was analyzed in the blood of eight atopic patients and two non-atopic subjects in combination with different concentrations of recombinant Fra a 1 isoforms. Bet v 1a served as a positive control and was used as a selection criterion for atopic patients. The results of the BAT with the eight recombinant Fra a 1.01E-1.08 proteins, which have an amino acid sequence identity of 74.5-97.5% with Fra a 1.02, showed clear differences in their allergenic potential. Fra a 1.03 and Fra a 1.02 showed the highest activation of basophils. Fra a 1.03 activated 73% and Fra a 1.02 66% of all basophils in the whole blood of atopic volunteers. Since the gene *Fra a 1.02* showed a high relative expression in the mature strawberry fruit and Fra a 1.03 was mainly expressed in the open flower, the isoform Fra a 1.02 was identified as the main strawberry allergen of the Bet v 1 superfamily.

The Western blot Assay was used to search for hypoallergenic strawberry varieties. The phenolic protein extracts of 51 naturally occurring white- and red-fruited strawberry varieties from three different strawberry species *F. xananassa*, *F. vesca* and *F. nilgerrensis* were tested with a polyclonal antibody against Fra a 1.02. After mass spectrometric identification of Fra a 1 isoforms in two of the isolated bands of the denaturing polyacrylamide gel, the varieties with the lowest concentration of Fra a 1 isoforms were selected and analyzed by BAT. Of the original 51 strawberry varieties, 12 potential hypoallergenic varieties and three red-fruited control varieties were investigated by BAT. The mean value of activated basophils stimulated by extracts from naturally occurring white- and red-fruited genotypes ranged from 36% to 84% for white-fruited varieties and from 44% to 76% for red-fruited genotypes. These data clearly showed that naturally occurring white-fruited strawberry varieties are not hypoallergenic per se. The protein extract from the white-fruited genotype *F. vesca* cv. Yellow

Wonder showed the lowest allergenic potential with only 36% activated basophils, but a high biological variability.

The possible interaction between the three strawberry allergens *Fra a 1.01E/1.02/1.03* and the putative FaAP was first investigated using Yeast Two-Hybrid. Based on a high autoactivation of the C-terminal sequence of FaAP, the resulting data were inconclusive. However, since the evidence was promising, a new analysis system called "time-resolved DNA switching" system was used to detect protein-protein interactions. *Fra a 1.01E*, *Fra a 1.02* and *Fra a 1.03* bind to FaAP with K_D values of 4.5 ± 1.1 , 15 ± 3 and 11 ± 2 nM. *Fra a 1.01E* forms a dimer, while *Fra a 1.02* and *Fra a 1.03* bind as monomer. The results suggest that PR-10 proteins are integrated into a protein interaction network and that FaAP binding is essential for the physiological function of *Fra a 1* proteins.

The presented results can make a valuable contribution to food safety, whereby the genes *Fra a 1.02* and *Fra a 1.03* could serve as markers for the breeding of red-fruited hypoallergenic strawberry varieties in future breeding programs. Furthermore, the interaction of the *Fra a 1* proteins with a protein of unknown function (FaAP), which was clearly demonstrated for the first time, shows that research into the physiological functions of the PR-10 proteins is only just beginning.

I Einleitung

1. Die Erdbeere

1.1 Wirtschaftliche Bedeutung

Die Erdbeere wird auf der ganzen Welt kommerziell gezüchtet und kultiviert. Die große tiefrote Frucht wird allseits geliebt und geschätzt für ihren süß-säuerlichen Geschmack, den hohen Nährstoffgehalt und auch wegen ihres Gesundheitswertes, der unter anderem auf einen hohen Gehalt an Vitamin C zurückzuführen ist (Souci, Fachmann et al. 2000). Nicht ohne Grund ist die Gattung *Fragaria* von weltweit hoher wirtschaftlicher Bedeutung.

Ca. 98% aller Erdbeeren werden in der nördlichen Hemisphäre produziert. In den Jahren 1961 bis 2014, im Durchschnitt betrachtet, bauten die beiden Kontinente Asien und Europa zu gleichen Teilen knapp 70% der weltweit produzierten Erdbeeren an. Auch Amerika und hier vor allem die USA produzierten 26,5% der weltweit konsumierten Erdbeeren. Afrika und Australien spielten mit insgesamt 3,8% eine untergeordnete Rolle in der Erdbeerproduktion (Abbildung 1) (FAOSTAT 2014).

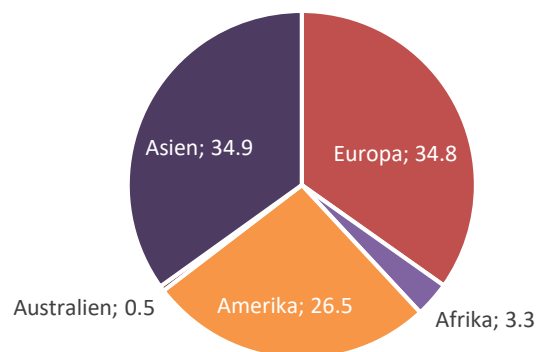


Abbildung 1 Weltweite Erdbeerproduktion: Vergleich der Kontinente von 1961-2014 in % (Quelle FAOSTAT 2014).

Die beliebten Erdbeeren werden in 84 Ländern auf der ganzen Welt in nennenswerten Mengen kommerziell angebaut. Im Jahr 2014 baute der Spitzenreiter China 3,1 Millionen Tonnen [Mt], die USA 1,37 Mt und Deutschland an zehnter Stelle 0,17 Mt an. Auch Mexiko (0,46 Mt), die Türkei (0,38 Mt), Spanien (0,29 Mt), Ägypten (0,28 Mt), Südkorea (0,21 Mt), Polen (0,20 Mt) und Russland (0,19 Mt) gehören zu den Top 10 Erdbeerproduzenten weltweit.

Im Zeitverlauf der Jahre 1961 bis 2014 wurden von 1961 mit 0,75 Mt im Jahr bereits 2014 weltweit 8,11 Mt produziert und somit 10,81-mal so viele Erdbeeren verglichen mit 1961 (Abbildung 2). Hinzu kommt, dass diese Masse an Erdbeeren im Jahr 1961 auf 0,9 km² und in 2014 auf 3,7 km² angebaut wurde. Durch verbesserte Anbaumöglichkeiten, den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln und natürlich einem enormen Fortschritt in der Züchtung der Erdbeere hinsichtlich Ertragssteigerung konnte der Flächenertrag von 1961 bis 2014 um das Vierfache gesteigert werden.

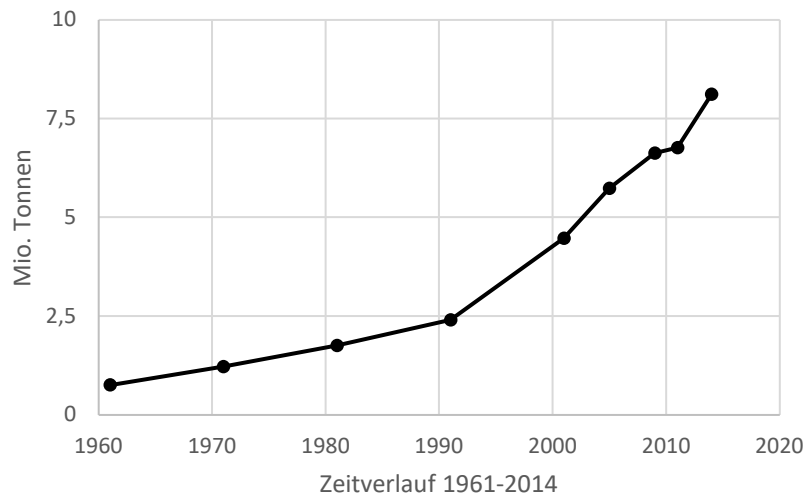


Abbildung 2 Weltweite Erdbeerproduktion in Mio. Tonnen von 1961-2014 (Quelle FAOSTAT 2014).

1.2 Geschichte und Entwicklung

Die Gattung *Fragaria* L. gehört zu der Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*), Unterfamilie *Rosoideae*. Neben der artenreichen und beliebten Rose (*Rosa* L.) gehören weitere interessante und wichtige Gattungen zu den *Rosaceae* wie *Rubus* L. (Brombeere, Himbeere), *Malus* Mill. (Apfel), *Prunus* L. (Aprikose, Kirsche, Pfirsich, Pflaume) und *Pyrus* L. (Birne) (Caesar 1977, Lieberei, Franke et al. 2007). Bereits im Römischen Reich zu Zeiten der Dichter Ovid und Vergil wurde *Fragaria* besungen und auch im Mittelalter wurde die Erdbeere in vielen Gemälden als christliches Symbol angesehen. Wegen der dreiteiligen Blätter wurde sie als Sinnbild für die Dreieinigkeit, wegen des niederen Wuchses als Symbol edler Demut und Bescheidenheit und wegen der roten nach unten geneigten Frucht als Metapher für das vergossene Blut Christi angesehen. Der französische König Karl V. war ein wahrer Fan der Erdbeeren. Im Jahre 1368 wies er seinen Gärtner Jean Dudoy an 1200 Erdbeerpflanzen im königlichen Garten des Louvre zu pflanzen (Darrow 1966, Hummer, Bassil et al. 2011).

Derzeit sind insgesamt 20 verschiedene Wildarten der Erdbeere bekannt, welche einen diploiden, tetraploiden, hexaploiden, octaploiden und decaploiden Chromosomensatz bezüglich des Basischromosomensatzes von $n=7$ aufweisen. Elf der diploiden Arten sind im eurasischen Raum beheimatet, doch eine der elf Arten weist eine deutlich größere geographische Verbreitung auf. *F. vesca* L. ist auch im nördlichen eurasischen Raum und auf dem gesamten amerikanischen Kontinent verbreitet. Die tetraploiden Arten sind auf den östlichen asiatischen Raum begrenzt und die hexaploide Art ist nur in Europa zu finden. Zwei der drei octaploiden Arten sind vor allem in Amerika und die dritte octaploide Art von den Kurilen bis Ostasien beheimatet (Staudt 1988). Eine decaploide Art – *F. iturupensis* – wurde abgeschieden auf der östlichen Seite des Berges Atsonupuri auf der Insel Iturup des Kurilen Archipels entdeckt (Hummer, Nathewet et al. 2009).

Der erste Nachweis der Kultivierung von Erdbeeren durch den Menschen geht auf das 14. Jahrhundert zurück. Zu dieser Zeit wurden meist *F. vesca* L., *F. moschata* Weston und *F. viridis* Weston angebaut und verzehrt. Erst in der Mitte des 18. Jahrhunderts wurden die kleinfruchtigen, aber sehr aromatischen Erdbeersorten durch die großfruchtige Gartenerdbeere *F. xananassa* Duch. aus den Gärten vertrieben. Diese noch heute am meisten kultivierte und durch einen enormen Züchtungsaufwand sehr variable Art entstand als zufälliges Kreuzungsprodukt der octaploiden südamerikanischen *F. chiloensis* (L.) Mill. (*F. chiloensis* subsp. *chiloensis* f. *chiloensis*) und der ebenfalls octaploiden nordamerikanischen Scharlacherdbeere *F. virginiana* subsp. *virginiana*. Mill. Diese octaploide ($2n=8x=56$) ökonomisch sehr bedeutsame Erdbeere wurde zuerst von dem französischen Botaniker Antoine Nicholas Duchesne im Jahre 1766 erkannt und beschrieben (Darrow 1966, Staudt 1988, Hancock, Sjulín et al. 2008, Horvath, Sánchez-Sevilla et al. 2011, Hummer, Bassil et al. 2011). Basierend auf dem frühen Beginn der kommerziellen Züchtung und Anbau ist zu beobachten, dass die genetische Variabilität von *F. xananassa* eingeschränkt ist. Durch den Erhalt wilder *Fragaria* Arten und deren Einbringung in die Züchtung neuer Sorten kann genetische Vielfalt erhalten werden. Aus dem

Genpool dieser alten und wilden *Fragaria* Spezies können wichtige Eigenschaften wie Resistenzen aber auch sensorische und ernährungsphysiologische Merkmale gewonnen werden (Horvath, Sánchez-Sevilla et al. 2011). Die Gattung *Fragaria* bietet eine biologische und genetische Vielfalt in Form von rot-, gelb- und weiß-fruchtigen, großen bis mittelgroßen, sehr aromatischen und köstlichen, aber auch ungenießbaren Sorten. Die genetischen Geheimnisse hinter den verschiedenen Farben, Größen und Aromen der Erdbeerarten sind jedoch bisher weitgehend unbekannt.

1.2.1 *Fragaria vesca*



Abbildung 3 *Fragaria vesca* cv. Reine des Vallées

Fragaria vesca L. ($2n=2x=14$) (Abbildung 3), die Walderdbeere, ist basierend auf biogeographischen Daten die am weitesten verbreitete wilde Erdbeere der Gattung *Fragaria*. Ihre Ausdehnung zieht sich über die gesamten gemäßigten Breiten von Asien über Europa bis Amerika. Sie wurde schon sehr lange als Ess-, Zier- und Arzneipflanze mit ihren kleinen dunkelroten Früchten und deren sehr intensiven aromatischen Geruch und Geschmack geschätzt. Einer der am häufigsten vorkommenden flüchtigen organischen Stoffe in reifen *F. vesca* Früchten ist Methylantranilat (MA), welches ein Produkt des Shikimat-Weges ist (Bohlmann, Lins et al. 1996, Ulrich, Hoberg et al. 1997). Die diploide Walderdbeere ist selbstkompatibel und hat vier Unterarten, die amerikanische *F. vesca* subsp. *americana*, *F. vesca* subsp. *bracteate*, *F. vesca* subsp. *californica* und

schließlich die europäische Unterart *F. vesca* subsp. *vesca* (Hancock and Luby 1993, Hummer, Bassil et al. 2011, Ulrich and Olbricht 2013).

Die diploide *F. vesca* ist eine exzellente Nutzpflanze für genetische und physiologische Studien und entwickelte sich zu dem Modellorganismus für die Untersuchung von nicht-klimakterischen Pflanzen bezüglich der Fruchtreifung und somit des Sekundärstoffwechsels. Die Gattung *Fragaria* hat nur einen geringen Platzbedarf bedingt durch ihren kleinen Wuchs, hat eine kurze Regenerationszeit, verglichen mit anderen Mitgliedern der *Rosaceae* Familie und liefert pro Ernte eine große Anzahl an Früchten. Es liegen effiziente Transformierungsstrategien vor und nicht zuletzt sind auch die geringe Genomgröße und die bereits vorhandenen EST-Sequenzen eine wichtige Quelle an Informationen (Slovin, Schmitt et al. 2009).

Im Jahr 2010 hat ein internationales Wissenschaftlerteam, federführend repräsentiert durch die Universität von North Texas und Florida, die komplette DNA Sequenz von 240 Mb der weiß-fruchtigen Walderdbeere *F. vesca* 'Hawaii 4' publiziert (<https://www.rosaceae.org/>). Dieser Meilenstein in der Forschung an der Gattung *Fragaria* mit dem vergleichsweise kleinen Genom bietet neue spannende Einblicke und Möglichkeiten. Denn das Genom von *F. vesca* weist beträchtliche Sequenzähnlichkeiten



Abbildung 4 *Fragaria vesca* cv. Yellow Wonder

zu den bekannten Sequenzen von kultivierten Erdbeersorten und von weiteren wichtigen Nutzpflanzen der *Rosaceae* Familie auf. Das Genom der kleinen wilden Walderdbeere *F. vesca* wird als Referenzgenom der Gattung *Fragaria* verwendet und stellt eine nützliche Quelle an genomischen Information für kultivierte Erdbeerarten dar (Shulaev, Sargent et al. 2011).

Auch die weiß-fruchtige Inzuchtlinie *F. vesca* f. *semperflorens* cv. Yellow Wonder (Abbildung 4) erregte Aufsehen in der wissenschaftlichen Gemeinschaft als ein möglicher weiterer Sequenzierungskandidat, um das Genom des Genotyps mit der reifen gelben Frucht mit dem Genom der weiß-fruchtigen *F. vesca* 'Hawaii 4' zu vergleichen (Deng and Davis 2001, Slovin, Schmitt et al. 2009).

1.2.2 *Fragaria ×ananassa*

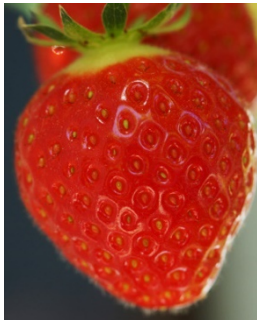


Abbildung 5 *Fragaria ×ananassa* cv. Elsanta

Die beliebte und kommerziell am häufigsten angebaute großfruchtige Gartenerdbeere *F. ×ananassa* Duch. (Abbildung 5) ist eine octaploide Art ($2n=8x=56$). Der hohe Polyploidiegrad von *F. ×ananassa* weist einen interessanten, aber bisher noch nicht vollständig aufgeklärten Stammbaum auf. Nur der letzte Schritt ist bisher nachgewiesen und dokumentiert. Sie entstand im frühen 18. Jahrhundert aus der zufälligen Kreuzung der beiden octaploiden Arten *F. chiloensis* (L.) Mill. und Pollen der *F. virginiana* Mill. (I.1.2) (Staudt 1961, Darrow 1966, Staudt 1988). Sie vereint die Widerstandsfähigkeit und Produktivität der *F. virginiana* mit der Fruchtgröße von *F. chiloensis*. Die Gartenerdbeere ist somit kein direkter Nachkomme von *F. vesca*. Doch mittels Genomanalysen konnte gezeigt werden, dass die beiden Arten, von welchen *F. ×ananassa* abstammt, auf verschiedene diploide Arten, darunter auch *F. vesca*, zurückzuführen sind (Rousseau-Gueutin, Gaston et al. 2009, Shulaev,

Sargent et al. 2011, Slovin and Michael 2011). Die basierend auf ihrem Geruch und ihrer Form benannte „Ananaserdbeere“ wurde seit Beginn des 19. Jahrhunderts mit beträchtlichem Aufwand gezüchtet. Nun gibt es über 600 Sorten von *F. ×ananassa*, welche sich in Form, Geruch und Geschmack unterscheiden (Staudt 1988, Hancock, Sjulín et al. 2008, Horvath, Sánchez-Sevilla et al. 2011, Hummer, Bassil et al. 2011). Die enormen Anstrengungen in der Züchtung führten zu einer Vielzahl an verschiedenen Sorten der Gartenerdbeere, wie zum Beispiel *F. ×ananassa* cv. Alba, cv. Calypso, cv. Camarosa, cv. Elegance, cv. Elsanta, cv. Mara des Bois, cv. Mieze Schindler, cv. Polka, cv. Senga Sengana und vielen mehr (Ulrich, Komes et al. 2007). Verschiedenste *F. ×ananassa* Sorten werden nun weltweit angebaut, wobei die Verbreitung der ursprünglichen *F. ×ananassa* Kreuzung auf die Küstenregionen von Kalifornien, Washington und Oregon beschränkt war (Hancock and Luby 1993). Alle diese klassischen Züchtungen - durch Kreuzung - führten jedoch über die Zeit zu einer Verminderung der genetischen Variabilität und unter anderem auch zum Verlust des typischen aromatischen Geschmacks der Walderdbeere. Deshalb wurde bereits im Jahre 1918 durch Elisabeth Schiemann mittels weiterer Züchtungen versucht, diesen aromatischen und gewünschten Geschmack wieder in die Art *F. ×ananassa* einzukreuzen (Kuckuck 1980).

Das Genom der octaploiden *F. ×ananassa* ist das wohl komplexeste Genom unter allen Nutzpflanzen. Dank des vollständig sequenzierten Genoms von *F. vesca* und den bereits vorhandenen EST-Sequenzen stellt auch die großfruchtige *F. ×ananassa* eine sehr interessante Modellpflanze für die Wissenschaft dar. Durch ermittelte Markergene kann die klassische Züchtung gezielter nach gewünschten Merkmalen selektieren und Erdbeeren mit besserem Geschmack, Lagerfähigkeit und auch geringerem allergenen Potential erzeugen.

Die Gartenerdbeere *F. ×ananassa* ist eine der meist konsumierten Früchte weltweit. Ihre attraktive und fleischige Frucht ist reich an Vitamin C, Ballaststoffen (z.B. Polysaccharide in der pflanzlichen Zellwand), antioxidativen Substanzen wie Anthocyanen und weiteren pflanzlichen Nährstoffen (Hancock and Luby 1993, Chapple and Carpita 1998, Aaby, Skrede et al. 2005). *F. ×ananassa* kann sich sowohl sexuell als auch asexuell durch Ausläufer vermehren (Slovin and Michael 2011).

1.2.3 *Fragaria nilgerrensis*

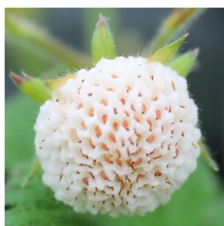


Abbildung 6 *Fragaria nilgerrensis* Mt. Omei 1

Eine weitere, meist unbekannte *Fragaria* Art ist die kleine und weiß-fruchtige asiatische Wilderdbeere *F. nilgerrensis* (Abbildung 6) ($2n=2x$). Die diploide *F. nilgerrensis* bestäubt sich selbst und weist zwei Unterarten auf, *F. nilgerrensis* subsp. *nilgerrensis* und subsp. *hayatae* (Staudt 1999). *F. nilgerrensis* subsp. *nilgerrensis* trägt weiße bis creme-farbene Früchte und ist im Nord- und Südwesten Indiens, dem östlichen Himalaya, dem nordöstlichen Burma, im Norden Vietnams sowie im Südwesten und in Zentral-China zu finden. Trotz dieser weitläufigen Verbreitung dieser Unterart sind morphologische Variationen kaum vorhanden. Die Frucht der Unterart *F. nilgerrensis* subsp. *hayatae* weist hingegen eine pinke bis rote Schale auf mit einem cremig gefärbten Cortex

(Staudt 1999). Sie ist bekannt für ihren hohen Gehalt an Anthocyaninen in allen Pflanzenorganen. *F. nilgerrensis* subsp. *hayatae* ist nur in Taiwan beheimatet (Darrow 1966, Staudt 1988).

Der Geschmack von *F. nilgerrensis* zeichnet sich durch seine starke, fruchtige und exotische Bananen-ähnliche oder Aprikosen-/Pfirsich-ähnliche Aromanote aus (Ulrich, Komes et al. 2007). Basierend auf diesem Aprikosen-/Pfirsich-ähnlichen Aroma heißt die wohl bekannteste Sorte der Erdbeerart *F. nilgerrensis* 'Apricot Chinoise', welche jedoch nicht kommerziell angebaut und vertrieben wird.

F. nilgerrensis stellt ein neu entdecktes Zuchtmaterial für *F. xananassa* dar. Ein Züchtungsansatz mit *F. xananassa* cv. Toyonoka und *F. nilgerrensis* führte zunächst zu sterilen pentaploiden Hybriden. Nach einer *in vitro* Colchizinbehandlung entstanden fruchtbildende interspezifische Hybride. Die vererbten Eigenschaften von *F. nilgerrensis* bestehen vor allem aus den stark behaarten Blatt- und Blütenstielen, der blass-pinken Färbung der reifen Früchte und dem *F. nilgerrensis* typischen Aprikosen-/Pfirsich-ähnlichen Aroma (Noguchi, Mochizuki et al. 1997).

1.3 Morphologie, Fruchtentwicklung, Inhaltsstoffe und positive gesundheitliche Effekte

Die Erdbeere ist eine mehrjährige, krautige, meist weiche und seidig behaarte Pflanze mit einem zentralen Vegetationskegel. Aus diesem gehen Blätter, Wurzeln, Blütenstände und Ausläufer (Stolon) hervor. Für die vegetative Vermehrung der Erdbeere bilden sich an der Achselknospe Ausläufer. An einem langen Internodium, welches an der Achselknospe entspringt, bildet sich nach dem ersten Knoten (Nodium) ein Ausläufer, an welchem eine Tochterrosettenpflanze zunächst Adventivwurzeln ausbildet. Diese vegetative Vermehrung von Pflanzen mittels Selbstaussäulern nennt man auch Blastochorie. *F. xananassa* bildet pro Jahr ca. 10-15 Ausläufer und auch die Tochterpflanzen beginnen sofort mit der vegetativen Vermehrung. Die langstieligen, wechsel- und grundständigen Laubblätter sind dreiteilig gefingert. Die Nebenblätter sind an der Basis des Laubblattstieles angewachsen (Caesar 1977, Hancock and Luby 1993, Lieberei, Franke et al. 2007).

Die meisten Erdbeeren tragen weiße Blüten, welche bis zu zehn Kelchblätter, fünf Kronblätter, 20-30 Staubblätter und eine Vielzahl an Fruchtblättern besitzen. Die Fruchtblätter, bestehend aus Griffel und Narbe, sind zu Stempeln verwachsen. Die Blüten stehen meist in Trugdolden zusammen und werden vor allem durch Bienen bestäubt (Abbildung 7) (Hancock and Luby 1993, Hanelt P. 1993, Hanhineva, Rogachev et al. 2008).

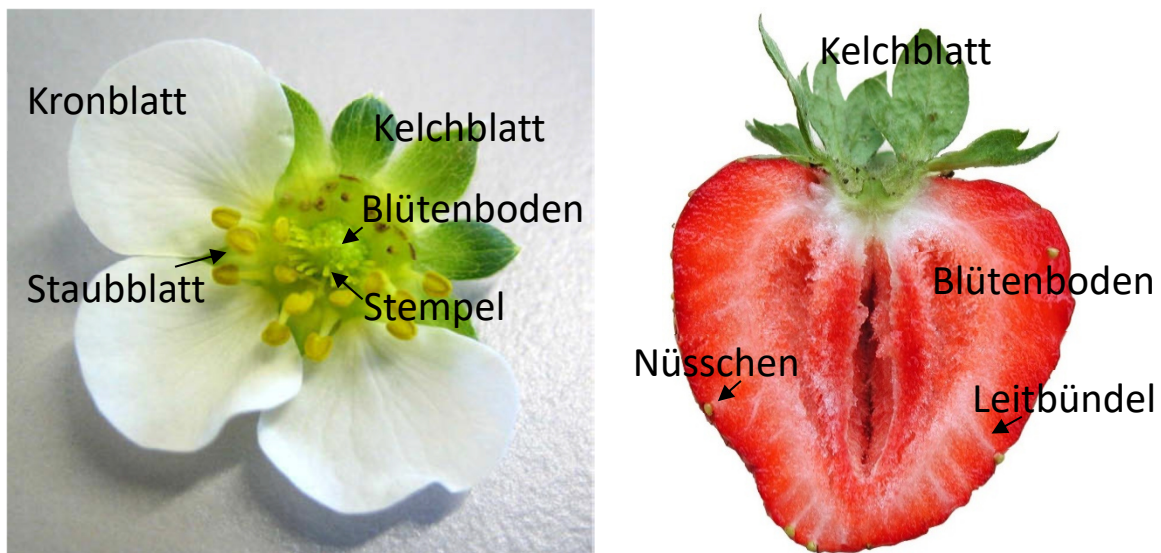


Abbildung 7 Blüte (l.) und Längsschnitt einer reifen Frucht (r.) von *F. xananassa* (Abbildung der Blüte von Hanhineva et al. 2008).

Bei der Frucht der Erdbeere handelt es sich aus botanischer Sicht um eine Sammelnussfrucht. Die eigentlichen Früchte, die kleinen Nüsschen, auch Achänen genannt, sind in der Epidermis des fleischigen Blütenbodens eingebettet. Hier werden sie über Leitbündel mit Nährstoffen versorgt. Die Erdbeerfrucht benötigt ca. 30 Tage, um aus der Blüte eine reife Frucht zu entwickeln. Während dieser Zeit durchläuft die Erdbeere drei Entwicklungsphasen, welche beginnend mit der Blüte über die

Zellteilung (10-15 Tage nach der Anthese (DPA)) hin zur Zellexpansion (20-35 DPA) bis zur Fruchtreifung (30-40 DPA) führt. Während der Reifezeit werden die Achenen durch die Vergrößerung des Blütenbodens (15-35 DPA), dem eigentlich genießbaren Teil der Erdbeere, auseinandergezogen. Im Zuge der Reifung werden in die Vakuolen der Zellen des Blütenbodens Anthocyane eingelagert (30-40 DPA), um somit attraktiv als Nahrungsquelle für Tiere zu wirken (Abbildung 7). Tiere, vom Rotfuchs über die Maus bis zur Amsel, scheiden die kleinen hartschaligen Nüsschen aus und sorgen somit für eine weite Verbreitung der Erdbeere. Diese Art der Verbreitung durch Frugivoren wird als Endochorie (Verdauungsausbreitung) bezeichnet (Hanelt P. 1993).

Bei der Gattung *Fragaria* handelt es sich um eine nicht-klimakterische Frucht. Dies bedeutet, dass die Fruchtreifung der Erdbeere unabhängig von einer erhöhten Ethylenbiosynthese erfolgt. Es konnte zwar eine erhöhte Ethylenproduktion nachgewiesen wird, welche sich aber allein auf die Nüsschen, die eigentlichen Früchte der Erdbeere, beschränkt. Ganz im Gegensatz zu klimakterischen Früchten wie zum Beispiel Äpfeln oder Bananen, welche eine gesteigerte Ethylenkonzentration für die Reifung benötigen (Giovannoni 2004, Iannetta, Laarhoven et al. 2006). Doch auch weitere Phytohormone sind an der Reifung der Erdbeerfrucht beteiligt. So befördert Auxin das Wachstum der Erdbeerfrucht, welches in den Nüsschen von vor allem den weißen bis früh-reifen Früchten (ca. 15-30 DPA) synthetisiert wird. Die abfallende Auxinproduktion in den Nüsschen geht einher mit der Pigmenteinlagerung in die Vakuolen und der Produktion der Aromastoffe (35-40 DPA; (Perkins-Veazie 1995, Manning 1998). Zudem führen freigesetzte Pektin-Methylesterasen und Cellulasen zu einer Erweichung der Textur. Abscisinsäure trägt entscheidend zur Anthocyanproduktion bei (Given, Venis et al. 1988, Civello, Powell et al. 1999, Zhang, Wang et al. 2010, Zifkin, Jin et al. 2012).

Erdbeerfrüchte sind nicht nur wegen ihrer attraktiven roten Färbung so beliebt, sondern auch wegen der gesunden und schmackhaften Inhaltsstoffe. Somit besteht eine reife *F. xananassa* Frucht zu 90% aus Wasser und 10% aus gelösten Verbindungen. Diese setzen sich aus einer Vielzahl an wichtigen Komponenten wie Vitaminen, Mineralstoffen und Spurenelementen zusammen. Je nach Sorte kann der Gehalt an Wasser und somit auch an weiteren Inhaltsstoffen schwanken. Der Brennwert einer reifen Frucht liegt etwa bei 30 kcal/100 g Frischgewicht. Weitere Inhaltsstoffe sind vor allem Zucker mit je ca. 2% Glukose, 2% Fruktose und 1% Saccharose, Ballaststoffe (ca. 1,5% v.a. Pektin), ca. 1,5% organische Säuren (v.a. Zitronensäure (88% aller enthaltenen Säuren), Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Oxalsäure, Weinsäure, Brenztraubensäure und Chinasäure), ca. 0,8% Proteine und 0,4% Gesamtfett (Hemphill and Martin 1992, Souci, Fachmann et al. 2000, Giampieri, Tulipani et al. 2012). Reife Erdbeerfrüchte enthalten auch eine Vielzahl an Mineralstoffen und Spurenelementen wie Calcium, Eisen, Magnesium, Phosphor, Kalium, Natrium, Zink, Kupfer und Mangan. Erdbeeren sind eine der Vitamin C reichsten Früchte. Vitamin C und auch andere Vitamine wie Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Vitamin K, Vitamin A und Vitamin E sind sehr wichtig für ein aktives Immunsystem und eine gesunde Entwicklung (Souci, Fachmann et al. 2000, Giampieri, Tulipani et al. 2012). Auch bioaktive Inhaltsstoffe und deren gesundheitsfördernde Wirkung treten immer mehr in den Vordergrund. So sind zum Beispiel Anthocyane (hier vor allem Pelargonidin 3-O-Glukosid (ca. 90%), Cyanidin- und weitere Pelargonidin-Derivate), Flavonoide, Ascorbinsäure, Tocopherol, Folsäure und weitere phenolische Verbindungen zu nennen, welche nicht nur Lipide und Proteine vor Oxidation schützen, sondern auch genomische DNA vor freien Radikalen. Anthocyane bilden die Farbe der reifen Früchte (Bakker, Bridle et al. 1994, Aaby, Ekeberg et al. 2007, Marzban, Maghuly et al. 2008). In der Summe ist die antioxidative Kapazität der Erdbeere zwei- bis elfmal so hoch wie die von Äpfeln, Pfirsichen, Trauben, Orangen, Tomaten und Kiwis (Wang, Cao et al. 1996, Scalzo, Politi et al. 2005) und können eine vorbeugende Wirkung gegen Krebs und Infektionen ausüben (Halbwirth, Puhl et al. 2006, Laimer and Maghuly 2010).

Einige klinische Studien zeigten sowohl in *in vivo* Tierversuchen als auch in *in vitro* Zellkulturstudien deutlich den positiven Effekt von Erdbeerpolyphenolen bei postprandialen Entzündungen und Insulinsensitivität. Erdbeerpolyphenole wirken entzündungshemmend, antikarzinogen, antiproliferativ, antioxidativ, antihyperglykämisch, antimikrobiell, neurodegenerativ und kardioprotektiv und haben somit eine positive Wirkung auf die menschliche Gesundheit (Edirisinghe, Banaszewski et al. 2011, Giampieri, Forbes-Hernandez et al. 2015, Afrin, Gasparrini et al. 2016, Huang,

Park et al. 2016). Die Wirkung einer glykämischen Kontrolle durch Erdbeerpolyphenole kann durch die Verstärkung der Insulinproduktion, die Förderung der Proliferation von pankreatischen β -Zellen und durch die Regulierung des Glukosestoffwechsels unter Verwendung verschiedener Mechanismen wie der Modifikation von oxidativem Stress, Entzündungen oder dem vermeintlichen Energiestatus der Zellen erklärt werden (Coleman, Hurst et al. 2016).

1.4 Flavonoidbiosyntheseweg

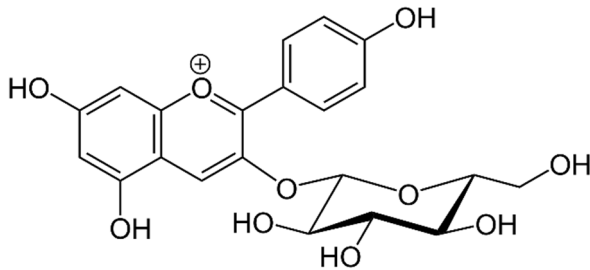


Abbildung 8 Beispiel für ein Polyphenol, Pelargonidin 3-O-Glukosid

Das Aroma der Erdbeere setzt sich aus bis zu 360 flüchtigen Substanzen zusammen, von welchen ca. 15 Komponenten entscheidend zum charakteristischen Erdbeergeruch beitragen (Latrasse 1991, Zabetakis and Holden 1997, Ulrich and Olbricht 2013). Die Substanzen, welche die Farbe der Erdbeere verursachen, sind zum überwiegenden Teil phenolische Substanzen. Diese sind ubiquitär im Pflanzenreich verbreitet und stellen die vielfältigste Gruppe aller pflanzlichen

Sekundärmetabolite dar. Das Spektrum von phenolischen Substanzen reicht von einfachen Phenylpropansäuren bis zu hochkomplexen Tanninen oder Ligninen (Ververidis, Trantas et al. 2007, Dai, Gupte et al. 2009, Pereira, Valentão et al. 2009). Da ihre chemische Struktur meist mehrere Phenolgruppen aufweist, werden sie auch Polyphenole (Abbildung 8) genannt. Phenolische Substanzen haben vielseitige Funktionen, sie sind zum Beispiel an der Kommunikation zwischen

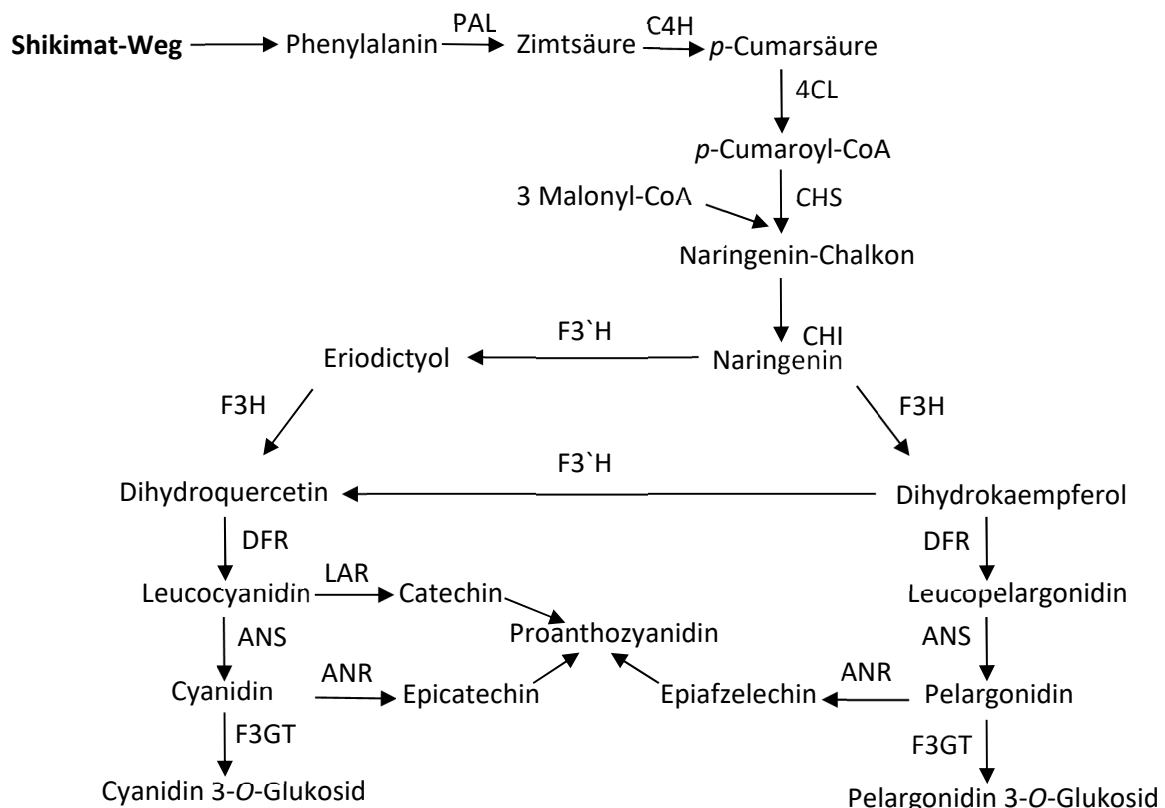


Abbildung 9 Schema des Flavonoidbiosyntheseweges in Erdbeerfrüchten. Anthocyane werden durch einen Multienzymkomplex, welcher locker mit dem Endoplasmatischen Retikulum assoziiert ist, hergestellt. (PAL, Phenylalanin-Ammonium-Lyase; C4H, Zimtsäure 4-Hydroxylase; 4CL, *p*-Cumaroyl-CoA-Ligase; CHS, Chalkon-Synthase; CHI, Chalkon-Isomerase; F3'H, Flavonoid 3'-Hydroxylase; F3H, Flavanon 3-Hydroxylase; DFR, Dihydroflavonol 4-Reduktase; LAR, Leucoanthocyanidin-Reduktase; ANS, Anthocyanidin-Synthase; ANR, Anthocyanidin-Reduktase; F3GT, Flavonoid 3-O-Glukosyltransferase (Halbwirth et al. 2006).

Pflanzen und anderen Organismen beteiligt, sind in Reaktionen auf biotischen und abiotischen Stress involviert, schützen die Pflanze vor schädigender UV-B-Strahlung und üben weitere Funktionen als Antimikrobiotika, Fraßschutz, Metall-Komplexbildner oder Farbstoff bzw. Lockstoff für die Fortpflanzung aus (Winkel-Shirley 2002, Lattanzio, Lattanzio et al. 2006, Agati and Tattini 2010, Li, Wang et al. 2010).

Die Polyphenole entstammen dem Shikimat-Biosyntheseweg, wobei die aromatische α -Aminosäure L-Phenylalanin den Beginn des Phenylpropanstoffwechsels und auch die Schnittstelle zwischen dem Primär- und Sekundärstoffwechselweg darstellt (Abbildung 9). Den Anfang des Flavonoidbiosyntheseweges markiert die Umwandlung von *p*-Cumaroyl-CoA mit 3 Molekülen Malonyl-CoA, welche dem Acetat/Malonat-Weg entspringen, katalysiert durch das Enzym Chalkon-Synthase (CHS). Nach der Umwandlung von Naringenin-Chalkon mittels Chalkon-Isomerase (CHI) in das Flavanon Naringenin gibt es zwei parallel verlaufende Biosynthesestränge, je nachdem ob der B-Ring einfach hydroxyliert bleibt oder durch die Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) zweifach hydroxyliert wird (Hanhineva, Kärenlampi et al. 2011). Naringenin und Eriodictyol, welches durch F3'H zweifach hydroxyliert wurde, werden anschließend durch die Flavonon 3-Hydroxylase (F3H) in Dihydrokaempferol bzw. Dihydroquercetin umgewandelt. Das Enzym Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR) katalysiert die Umwandlung der Vorprodukte in Leucopelargonidin bzw. Leucocyanidin. Das äußerst Substrat-(Leucocyanidin) spezifische Enzym Leucoanthocyanidin-Reduktase (LAR) in *F. xananassa* führt dazu, dass in der Erdbeere nur Catechin gebildet wird und kein Afzelechin (Almeida, D'Amico et al. 2007). Im Gegensatz zur LAR setzt das Enzym Anthocyanidin-Reduktase (ANR) sowohl das Cyanidin als auch Pelargonidin in Epicatechin bzw. Epiafzelechin um. Die Biosynthese der komplexen oligo- und polymeren Kondensationsprodukte (Proanthocyanidine) ist im Gegensatz zur Synthese von Anthocyanen bisher weitgehend unklar (Dixon, Xie et al. 2005, Zhao, Pang et al. 2010). Pelargonidin und Cyanidin, welche durch die Anthocyanidin-Synthase (ANS) aus Leucopelargonidin bzw. Leucocyanidin katalysiert werden, werden durch das reifekorrelierte Enzym Flavonoid 3-O-Glukosyltransferase (F3GT) in die – je nach vorliegendem pH-Wert – orangen bis violetten Anthocyanidine Pelargonidin 3-O-Glukosid und Cyanidin 3-O-Glukosid umgewandelt (Halbwirth, Puhl et al. 2006, Griesser, Hoffmann et al. 2008a, Griesser, Vitzthum et al. 2008b).

2. Allergie – Nahrungsmittelallergie

Allergien werden heutzutage als Volkskrankheit bezeichnet. Tatsächlich sind allergische Reaktionen aber bereits seit Jahrhunderten bekannt. Bereits Hippokrates beschrieb um 400 v. Chr. einen Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Käse und einer allergischen Reaktion. Weitere Überlieferungen stammen aus der Regierungszeit des englischen Königs Richard III., welcher mutmaßlich unter einer Erdbeerallergie litt. Er ließ sich bei Zusammenkünften mit politischen Gegenspielern Erdbeerfrüchte servieren und klagte diese bei Auftreten von allergischen Symptomen des versuchten Giftmordes an (Drach 2010).

Der Begriff Allergie hat seinen Ursprung in den beiden griechischen Wörtern „allos“, welches „anders“, und „ergos“, welches „Tätigkeit“ bedeutet. Dies kann auch mit den Worten „Veränderung des ursprünglichen Zustandes“ übersetzt werden. Clemens Peter Freiherr von Pirquet, ein österreichischer Kinderarzt, generierte ursprünglich den Begriff Allergie im Jahre 1906 (Pirquet 1906). Bei Allergien handelt es sich im Allgemeinen um eine übersteigerte immunologische Reaktion auf normalerweise harmlose Stoffe. Diese harmlosen Umweltstoffe werden auch Allergene oder Antigene genannt. Bei dieser Überempfindlichkeitsreaktion, oder auch Hypersensitivität, werden im Körper klinische Symptome ausgelöst. Diese äußern sich als orales Allergiesyndrom (OAS) und führen zu Jucken in Gaumen oder Rachen, Zungenbrennen, seltener zu Blähungen und Diarrhö. Durch Schleimhautschwellung im Rachen- und Kehlkopfbereich kann es auch zu Schluck- und Atembeschwerden kommen. Auch generalisierte anaphylaktische Reaktionen mit Rhinitis, Asthma, Urtikaria und Schock sind möglich (Biedermann, Heppt et al. 2016).

Es gibt eine Vielzahl von Allergenen. Die wichtigsten von den Jahreszeiten abhängigen Allergenen sind Pollen von Gräsern, Sträuchern und Bäumen, wobei die bedeutendsten ganzjährig vorkommenden

Allergene Hausstaubmilben und Tierhaare sind. Des Weiteren werden Allergien von Insektengiften und chemischen Substanzen ausgelöst (Renz, Kaminski et al. 2008).

Allergische Erkrankungen sind vor allem in Industrieländern deutlich auf dem Vormarsch (Kay 2001). Allein in Deutschland leidet jeder Vierte bis Fünfte an einer Allergie (Renz, Kaminski et al. 2008). Trotz eines erhöhten Bewusstseins für allergische Erkrankungen und gesteigerten wissenschaftlichen Anstrengungen scheint es, als gäbe es weitere Faktoren, neben genetischer Disposition und der „Hygienehypothese“ (Strachan 1989) für den Anstieg an allergischen Individuen zu geben. So wird berichtet, dass in Familien mit einem erhöhten Allergierisiko wegen vorbelasteter Eltern jedes vierte Kind und in Familien ohne anamnetische allergische Geschichte nur jedes zehnte Kind an Allergien erkrankt (Renz, Kaminski et al. 2008). Es wird postuliert, da die Prägung des Immunsystems in den ersten Lebensjahren stattfindet, könne das Immunsystem keine Immunabwehr gegen fehlende Reize aufbauen. Dies kann somit zu allergischen Erkrankungen im weiteren Alter führen (Strachan 1989).

2.1 Type-I-Allergie

Im Jahre 1963 wurden vier verschiedene Pathomechanismen der Überempfindlichkeit klassifiziert (Gell and Coombs 1963). Bei der Typ-I-Allergie handelt es sich um die Allergie vom Soforttyp. Die antikörpervermittelte zytotoxische Reaktion ist die Typ-II-, die Immunkomplex-vermittelte Reaktion die Typ-III- und die verzögerte Hypersensitivität die Typ-IV-Allergie.

Die allergische Reaktion des Soforttyps ist charakterisiert durch eine Reaktion, die von Allergenen hervorgerufen wird, zum Beispiel durch das Inhalationsallergen der Birkenpollen. Durch die Bindung von Allergenen an präformierte allergenspezifische IgE-Antikörper werden Immunkomplexe gebildet, die über die FcεRI-Rezeptoren Effektorzellen wie Mastzellen oder basophile Granulozyten aktivieren. Deshalb wird diese Art der Immunantwort auch als IgE-assoziierte Allergie bezeichnet, welche vor allem bei atopischen Individuen vorkommt (Hausen 1997). Das Wort Atopie bezeichnet wiederum die Neigung eines Individuums als Immunantwort auf Allergenkontakt mit der Produktion von spezifischen IgE-Antikörpern zu reagieren (Biedermann, Heppt et al. 2016). Allergene, welche Antigene sind, werden von spezifischen IgE-Antikörpern erkannt. Im Falle der IgE-assoziierten Allergie handelt es sich bei fast allen Allergenen um Proteine. Bei Immunglobulin E handelt es sich um Glykoproteine auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten, welche durch aktivierte B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen gebildet werden.

Der pathologische Mechanismus wird in zwei voneinander getrennte Phasen eingeteilt. In der ersten symptomfreien allergischen Sensibilisierung dringt das Allergen über die Haut oder Schleimhäute in den Organismus ein. Makrophagen, welche zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) zählen, nehmen das Allergen auf, zerkleinern es und präsentieren mittels ihres MHC-Klasse II-Komplexes die entstandenen Allergenfragmente auf der Oberfläche. Der MHC-Klasse II-Proteinkomplex besteht aus zwei gleich großen membranverankerten α- und β-Untereinheiten. Die Domänen α₁ und β₁ formen zusammen die Peptidbindungsfurche, in der das Allergenpeptid gebunden wird (Schütt and Bröker 2011). CD4⁺ T-Helferzellen erkennen und binden nun an die Allergenfragmente und werden zu T-Helferzellen des Typs 2 aktiviert. Durch die Ausschüttung von Interleukin-4 durch die T-Helferzellen reifen B-Lymphozyten zu Plasmazellen heran und produzieren spezifische Antikörper des IgE-Typs gegen das Allergen (Trautmann, Heuck et al. 2006). Die IgE-Antikörper binden dann an die Oberfläche der Mastzellen und basophilen Granulozyten. Die allergische Sensibilisierung ist somit die erste Antwort des Immunsystems und führt über einen T-Zell-abhängigen Prozess zur Produktion von allergenspezifischen IgE-Antikörpern. Es kommt zu einer allergenspezifischen IgE- und T-Zell-Gedächtnis-Immunantwort (Biedermann, Heppt et al. 2016).

In der zweiten Phase, der Effektorphase, kommt es zu einem wiederholten Kontakt zu dem Allergen, welcher eine Ankurbelung der IgE-Immunantwort (engl.: „boost“) zur Folge hat. In dieser Phase kommt es durch eine Allergen-Antikörperbindung zu einer Kreuzvernetzung der IgE-Antikörper (engl.: cross-linking). Durch das Kreuzvernetzen der IgE-Antikörper über die Allergene wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt. Es kommt zur Induktion der Degranulation der Mastzellen und basophilen Granulozyten und zur *de novo* Synthese und Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Prostaglandinen, Histaminen, Interleukinen und Leukotrienen. Durch die Freisetzung dieser Entzündungsmediatoren entwickeln sich innerhalb weniger Minuten die für den Soforttyp typischen Symptome wie zum

Beispiel Gefäßweiterung, Rötung, Anschwellen der Haut und Schleimhäute, Jucken, Brennen, Naselaufen, Augentränen und Hustenreiz (OAS und *rhinoconjunctivitis allergica* (RA)) (Catalin 1997, Hausen 1997, Van Neerven, Knol et al. 2006, Biedermann, Heppt et al. 2016).

Um die Degranulation der Mastzellen und basophilen Granulozyten zu induzieren, benötigt ein Allergen mindestens zwei Epitope für eine IgE-Bindung. Das Ausmaß und die Stärke der Degranulation hängt von der Anzahl der IgE-Epitope am Allergen und der Menge des verfügbaren allergenspezifischen IgE's ab. Auch die Topologie der Epitope kann einen Einfluss auf die Degranulationsstärke haben. So wird vermutet, dass eine Epitopenansammlung an gewissen Stellen eines Allergens die Rezeptoraggregation erleichtern kann (Flicker, Steinberger et al. 2006).

Um eine Allergie wirkungsvoll behandeln zu können, muss zunächst eine eingehende und gründliche Anamnese durchgeführt werden. Dies beinhaltet nicht nur die Untersuchung einer familiären Disposition, sondern auch Fragen über Beschwerden, den Verlauf der Krankheit, die zeitliche Abhängigkeit und eventuell bereits nachgewiesene Allergien. Es gibt verschiedene Testverfahren mit welchen Allergien wirkungsvoll nachgewiesen werden können (Ciardiello, Tamburrini et al. 2013).

- Pricktest: Von Piquet modifizierte den von Robert Koch 1890 vorgestellten Tuberkulintest, indem er das Tuberkulin auf die Haut des Unterarms auftrug und mit einer Impflanzette oder Prick-Lanzette durch den Tropfen stach und die Haut sakrifizierte (Von Pirquet 1907, Ebruster 1959). Eine Erweiterung des Prick-Tests stellt der Prick-to-Prick Test dar. Hier wird mit der Prick-Lanzette zunächst in frische Lebensmittel und anschließend mit derselben Lanzette in die Haut der mutmaßlich sensibilisierten Person geritzt. In beiden Verfahren werden bei Personen, welche unter der Allergie leiden, durch die Mastzellen und basophilen Granulozyten Entzündungsmediatoren freigesetzt und es kommt zu einer lokalen allergischen Reaktion. Als Positivkontrolle wird eine Histaminlösung und als Negativkontrolle physiologische Kochsalzlösung aufgetragen (Hausen 1997, Kreft, Bauer et al. 2013, Biedermann, Heppt et al. 2016). Bei einem Durchmesser der lokalen Rötung (F) und Quaddel (W) jeweils von 3 mm, wird von einer allergischen Reaktion ausgegangen. Dieses Nachweisverfahren wird auch Skin-Prick-Test (SPT) genannt.
- Immuno-CAP-Test: Zur Bestätigung der Hauttests und zum Nachweis und zur Quantifizierung spezifischer IgE-Antikörper wird das Immuno-CAP-System eingesetzt. Der jeweilige Allergenextrakt wird an eine unlösliche Matrix gebunden und zusammen mit Patientenblut inkubiert. Spezifische Antikörper gegen IgE-Antikörper, die nun im Komplex mit dem Allergen vorliegen, werden hinzugegeben und sind durch ein Enzym markiert. Die IgE-Bindung kann nun durch eine spektro-photometrische Messung anhand des Farbumschlags eines Substrates durch das Enzym bestimmt werden. Die IgE-Bindung ist zur Allergenkonzentration proportional (Hausen 1997). Die Wahrscheinlichkeit für eine Allergie kann in CAP-Klassen von eins bis sechs eingeteilt werden, wobei die CAP-Klasse eins eine negative Allergie mit 0,1-0,35 kU/L spezifischen IgE-Antikörper und die CAP-Klasse sechs eine sehr stark positive Allergie mit einer Konzentration von spezifischen IgE von > 100 kU/L beschreibt.
- Basophilen Aktivierungstest: Dieses Nachweisverfahren wurde in dieser Arbeit eingesetzt und wird unter dem Punkt I.3.1 eingehend erläutert.

2.2 Pathogenesis-related Proteinfamilie 10

Pflanzliche Allergene können abhängig von der Art und Weise der primären Sensibilisierung in zwei Klassen eingeteilt werden. Prolin, Cupin und Cysteinproteinasen sind der ersten Klasse der pflanzlichen Allergene zuzuordnen. Sie sind im Allgemeinen robuste Allergene und halten der Degradation im Gastrointestinaltrakt stand. Bei den pflanzlichen Allergenen der Klasse II handelt es sich um Pollenallergene. Die primäre Sensibilisierung findet über die Atemwege statt wie zum Beispiel durch das Inhalationsallergen Bet v 1 aus den Birkenpollen (Karlsson, Alm et al. 2004).

In der Superfamilie der Bet v 1-homologen Proteinen, welche nach dem Haupt-Birkenpollenallergen Bet v 1 benannt ist, sind Bet v 1-homologe Proteine zusammengefasst. Die Superfamilie der Bet v 1-homologen Proteine zählt 23.609 Mitglieder aus 4.418 Arten. Insgesamt umfasst die Superfamilie der Bet v 1-homologen Proteine 14 Familien, wobei Bet v 1 eine dieser Familien darstellt. Die Bet v 1-Familie selbst ist in elf Subfamilien untergliedert. In der zytoplasmatischen Subfamilie der

Pathogenesis-related class 10 Proteinfamilie (PR-10) sind fast alle bekannten Bet v 1-homologen Allergene zu finden (Biedermann, Heppt et al. 2016). Somit gehört eine große Anzahl der Pflanzenallergene der Klasse II zu der heterogenen Familie der ubiquitär vorkommenden und konservierten PR-10 Proteinfamilie. Es liegt eine Sequenzähnlichkeit von Bet v 1-homologen Proteinen und dem Haupt-Birkenpollenallergen Bet v 1 von 40-70% vor. Bet v 1-homologe Proteine bestehen aus 153 bis 160 Aminosäuren und weisen ein Molekulargewicht von ca. 17-22 kDa auf (Von Loetzen, Schweimer et al. 2012). Bekannte Vertreter der PR-10 Subfamilie, die allergische Reaktionen bei sensibilisierten Individuen auslösen können, sind Bet v 1, das Haupt-Birkenpollenallergen (Swoboda, Hoffmann-Sommergruber et al. 1996), Mal d 1, das Haupt-Apfelallergen (Vanekkrebitz, Hoffmannsommergruber et al. 1995), Pru ar 1 aus Aprikosen, Pru av 1 aus der Kirsche (Neudecker, Schweimer et al. 2001), Dau c 1 aus der Karotte (Yamamoto, Torikai et al. 1997), Api g 1 aus Sellerie (Schirmer, Hoffmann-Sommergrube et al. 2005) und Fra a 1 aus Erdbeerfrüchten (Karlsson, Alm et al. 2004).

PR-10 Gene bilden eine Multigenfamilie, in welcher einige Mitglieder konstitutiv in definierten Pflanzengewebe exprimiert werden, während andere unter bestimmten Umweltbedingungen induziert werden (Lebel, Schellenbaum et al. 2010, Hyun and Kim 2011). Dies lässt vermuten, dass PR-10 Proteine sowohl in der pflanzlichen Entwicklung (Hoffmann-Sommergruber 2000) eine große Rolle spielen, als auch ein Teil des hochkomplexen Pflanzen-induzierten Abwehrmechanismus sind (Yan, Qi et al. 2008). PR-10 Proteine sind weithin als ein Teil des Pflanzenabwehrsystems bekannt und werden als Bestandteil der systemisch erworbenen Abwehr induziert. Die Expression von PR-10 Proteinen wird als Reaktion auf eine Pathogeninfektion (Pilze (Somssich, Schmelzer et al. 1986, Walter, Liu et al. 1990), Bakterien (Somssich, Schmelzer et al. 1986), Viren), aber auch bei abiotischen Stressoren (Verwundung (Warner, Scott et al. 1992), Salzstress, Hitzestress (Walter, Liu et al. 1990)) und weiteren nachteiligen Umgebungsbedingungen (Hoffmann-Sommergruber 2002, Breiteneder and Radauer 2004, Laimer and Maghuly 2010) stark erhöht. Daher können Bet v 1-homologe Proteine wie Fra a 1 und folglich die Allergenität von Erdbeerfrüchten durch ungünstige biotische und abiotische Faktoren beeinflusst und induziert werden (Karlsson, Alm et al. 2004, Radauer and Breiteneder 2007).

Bei der Klasse der PR-10 Proteine handelt es sich um intrazelluläre ubiquitär vorkommende Proteine, die alle eine ähnliche Struktur, Größe (17-22 kDa) und konservierte Motive aufweisen (Puehringer, Zinoecker et al. 2003). Die leicht sauren Proteine sind zytosolisch lokalisiert und unter Samenpflanzen weit verbreitet. Bisher ist die physiologische Funktion von PR-10 Proteinen in Pflanzen nicht ausreichend charakterisiert, obwohl einige Mitglieder dieser Proteinfamilie eine Phosphorylierungs-abhängige Ribonukleaseaktivität (Besbes, Franz-Oberdorf et al. 2019) aufweisen, als pflanzlicher Steroidträger diskutiert werden (Van Loon, Rep et al. 2006) und eine Cytokinin- oder DNA-Bindeaktivität besitzen (Beuning, Bowen et al. 2004).

2.3 Kreuzreaktivität am Beispiel der Birkenpollenallergie

Nahrungsmittelallergien betreffen 2,6% der 18 bis 70-jährigen deutschen Bürger (Zuberbier, Edenharter et al. 2004) und werden meist sekundär durch eine Kreuzallergie erworben. Ein hoher Prozentsatz von Patienten mit Inhalationsallergien gegen Birkenpollen (ca. 70% der Birkenpollenallergiker) zeigt Kreuzreaktionen mit Nahrungsmitteln, wie frischem Obst und Gemüse. Dies beruht auf homologen Proteinen, welche gemeinsame Epitope mit strukturellen und sequenziellen Ähnlichkeiten besitzen und deren drei-dimensionale Strukturen nahezu identisch sind. Diese gemeinsamen Epitope homologer Proteine von vielen Mitgliedern der PR-10 Proteinfamilie reagieren mit spezifischen IgE-Antikörpern von mit Birkenpollen sensibilisierten Patienten und lösen so eine allergische Reaktion aus (Gajhede, Osmark et al. 1996, Vieths, Scheurer et al. 2002, Marković-Housley, Degano et al. 2003, Neudecker, Lehmann et al. 2003, Katelaris 2010, Kaiser, Mageney et al. 2016). Bei Jugendlichen und Erwachsenen ist die immunologische Kreuzreaktion (Kreuzallergie) die häufigste Ursache für Nahrungsmittelallergien (Henzgen, Vieths et al. 2005).

Die häufigste Kreuzallergie bei einer Inhalationsallergie gegen Birkenpollen sind Nahrungsmittelallergien gegen Apfel, Pfirsich, Pflaume, Nektarine, Kiwi, Kirsche, Birne, Karotte, Sellerie und Erdbeere. Etwa 30% der Patienten im nördlichen Europa, die an einer Nahrungsmittelallergie leiden, zeigen negative Reaktionen auf Erdbeeren (Eriksson, Moller et al. 2004).

Die Kreuzreaktivität zum Beispiel zwischen den Allergenen Bet v 1, Mal d 1 (Haupt-Apfelallergen) und Fra a 1 (Haupt-Erdbeerallergen) ist auch in der Proteinsequenzidentität zu suchen, da die Proteinsequenzähnlichkeit mit 56,5% (Mal d 1 und Bet v 1), 58,4% (Bet v 1 und Fra a 1.02) und 77% (Mal d 1 und Fra a 1.02) sehr hoch ist.

Fra a 1 Proteine, homologe Proteine zu dem Haupt-Birkenpollenallergen Bet v 1, führen, basierend auf der Bet v 1-vermittelten IgE-Kreuzreaktivität, zu den gleichen *in vivo* Symptomen wie das orale Allergiesyndrom (OAS) einschließlich Juckreiz, Dermatitis und Urticaria (Karlsson, Alm et al. 2004, Zuidmeer, Salentijn et al. 2006, Franz-Oberdorf, Eberlein et al. 2016, Kaiser, Mageny et al. 2016).

2.4 Untersuchte PR-10 Proteine und FaAP

2.4.1 Haupt-Birkenpollenallergen Bet v 1

Der wichtigste Vertreter der PR-10 Proteinfamilie ist das Haupt-Birkenpollenallergen Bet v 1, welches bereits 1988 erstmals publiziert wurde (Breiteneder, Pettenburger et al. 1989, Faber, Lindemann et al. 1996). Das Allergen Bet v 1 ist in den Pollen von *Betula verrucosa* zu finden, welche zur botanischen Ordnung *Fagales* gehört. Wie bereits erwähnt ist die Sensibilisierung gegen Bet v 1 verantwortlich für die IgE-vermittelte Kreuzreaktion gegenüber anderen homologen Proteinen in Obst- und Gemüsearten (Karlsson, Alm et al. 2004). Bet v 1 ist für mehr als 95% aller allergischen Reaktionen gegenüber Birkenpollen verantwortlich (Beuning, Bowen et al. 2004). Die Sekundär- und Tertiärstruktur (Abbildung 10) des Birkenpollenallergens Bet v 1, welches ein Molekulargewicht von 17 kDa aufweist, konnte mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. Die zwei- und drei-dimensionale Analyse des Proteins Bet v 1 zeigt, dass es sich um ein globuläres Monomer handelt (Faber, Lindemann et al. 1996). Die Struktur von Bet v 1 folgt der Anordnung β - α_2 - β_6 - α mit einem antiparallelen β -Faltblatt, welches die lange C-terminale α -Helix umhüllt. Ein besonderes Merkmal der Bet v 1 Tertiärstruktur ist eine große hydrophobe Höhle, die eine Bindestelle für Liganden darstellen könnte (Mogensen, Ferreras et al. 2007, Radauer, Lackner et al. 2008).



Abbildung 10 Tertiärstruktur des Haupt-Birkenpollenallergens Bet v 1 (Mirza et al. 2000)

In allen PR-10 Proteinen, so auch in Bet v 1, gibt es ein auffallend Glycine-reiches konserviertes Sequenzmotiv [GXGGXGTXX], welches in der Proteinsequenz zwischen den Aminosäuren 47-55 verortet ist (Hoffmann-Sommergruber, Vanek-Krebitz et al. 1997). Die dreidimensionale Struktur von Bet v 1 zeigt den Glycin-reichen Phosphat-Bindungs-Loop (P-Loop), welcher an der Bildung der großen hydrophoben Höhle beteiligt ist (Gajhede, Osmark et al. 1996). Dieser Glycin-reiche P-Loop weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zur START-Domäne des menschlichen Proteins MLN64 auf, welches am Transport von Cholesterin mitwirkt (Tsujishita and Hurley 2000).

Bet v 1 zeigt eine Affinität zu verschiedenen Liganden, wie den Flavonen und dem Flavanon Naringenin (Laimer and Maghuly 2010), aber auch zu Fettsäuren, Phospholipiden oder Pflanzenhormonen wie Cytokinin und Brassinosteroiden (Mogensen, Ferreras et al. 2007, Radauer, Lackner et al. 2008). Es wird aber auch, da zwei Moleküle Deoxycholat fest an die hydrophobe Höhle von Bet v 1 gebunden werden können, eine Transportfunktion von Bet v 1 für pflanzliche Steroide angenommen (Marković-Housley, Degano et al. 2003, Laimer and Maghuly 2010, Muñoz, Hoffmann et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Bet v 1 in der Lage ist an Membranen zu binden und diese zu permeabilisieren (Mogensen, Ferreras et al. 2007). Aus reifen Birkenpollen konnte der natürliche Ligand, Quercetin 3-O-Sophorosid (Q3OS), welcher an Bet v 1 gebunden war, identifiziert werden. Des Weiteren konnte die Bindung von Bet v 1 und Quercetin 3-O-Sophorosid durch die Wiederherstellung des Bet v 1-Q3OS Komplexes verifiziert werden (Von Loetzen, Hoffmann et al. 2014).

Eine spezifische Immuntherapie gegen die Birkenpollenallergie ist die Hyposensibilisierung, welche eine krankheitsmodifizierende Behandlungsmöglichkeit darstellt. Durch eine steigende und wiederholte Exposition der atopischen Person mit aufgereinigtem Allergen entwickelt das Immunsystem eine Toleranz. Die spezifische Immuntherapie wirkt sich sowohl auf molekulare Prozesse als auch auf das Mikrobiom der Nasenschleimhaut positiv aus. Die RNA-Sequenzanalysen von nicht-atopischen Probanden, atopischen Probanden mit und ohne subkutane Immuntherapie wurden verglichen. Die atopischen Probanden mit subkutaner Immuntherapie zeigten, im Vergleich zu atopischen Probanden ohne Therapie, einen verminderten Symptomscore und eine Neuprogrammierung des nasalen epithelialen Transkriptoms während der Pollensaison. Des Weiteren nähert sich die mikrobielle Diversität der atopischen Probandengruppe mit subkutaner Immuntherapie derjenigen der nicht-atopischen Kontrollgruppe an (Hanif, Dhaygude et al. 2019).

2.4.2 Haupt-Erdbeerallergen Fra a 1

Über die Überempfindlichkeit gegenüber Erdbeerfrüchten wird häufig berichtet, aber es gibt nur wenige Studien, in welchen die von der Allergie betroffenen Patienten und das allergene Potenzial verschiedener Erdbeervarietäten tatsächlich untersucht werden (Grattan and Harman 1985, Weltfriend, Kwangstith et al. 1995, Taylor, Lever et al. 1996, Eriksson, Moller et al. 2004, Hjernø, Alm et al. 2006, Kaiser, Mageney et al. 2016). Die von einer Allergie gegen Erdbeeren (*F. xananassa*) betroffenen Individuen in Nordeuropa leiden meistens an einer allergischen Überempfindlichkeitsreaktion (OAS) basierend auf einer Bet v 1-vermittelten Kreuzreaktivität, die durch die Fra a 1 Allergene ausgelöst werden (Karlsson, Alm et al. 2004, Zuidmeer, Salentijn et al. 2006, Franz-Oberdorf, Eberlein et al. 2016, Kaiser, Mageney et al. 2016).

Bei den Fra a 1 Proteinen handelt es sich um homologe Proteine zu dem Haupt-Birkenpollenallergen Bet v 1. Fra a 1 kann ebenfalls in die Bet v 1-homologe Superfamilie und die Subfamilie PR-10 eingeordnet werden (Karlsson, Alm et al. 2004, Laimer and Maghuly 2010). Die Erdbeerallergen-Familie Fra a 1 zeigt im Durchschnitt (Fra a 1.01E-1.08) eine Sequenzähnlichkeit von 58,15% zu Bet v 1 und 77% zu dem Haupt-Apfelallergen Mal d 1 (Abbildung 11) (Hjernø, Alm et al. 2006).

Durch die Untersuchung der gDNA von *Fra a 1.01* konnten von drei unterschiedlichen Erdbeervarietäten Nukleotidsequenzen mit Längen von 584, 591 oder 594 Basenpaaren gefunden werden. Alle diese Gene enthalten ein Intron mit einer Länge von entweder 101 oder 110 Nukleotiden. Nach deren Sequenzierung wurden fünf potenzielle Fra a 1.01 Allele mit einer Sequenzhomologie von mehr als 97% mit der Nomenklatur Fra a 1a-e benannt. Die Aminosäuresequenzen dieser Gene unterscheiden sich in nur sieben Positionen (Musidowska-Persson, Alm et al. 2007). Das Molekulargewicht der Fra a 1 Isoformen beträgt ca. 17 kDa.

Nachdem 2010 das vollständige Genom von *Fragaria vesca* 'Hawaii 4' vorlag, zeigte sich, dass die Gattung *Fragaria* eine ganze Familie von Fra a 1-homologen Genen enthält (Hjernø, Alm et al. 2006, Muñoz, Hoffmann et al. 2010, Hyun and Kim 2011, Shulaev, Sargent et al. 2011) und dass die vermeintlichen Isoformen Fra a 1 a-e allelische Formen darstellen (Musidowska-Persson, Alm et al. 2007). Zum besseren Verständnis und in Übereinstimmung mit der Nomenklatur für Allergenproteine (Chapman, Pomés et al. 2007) wurden die Allelformen Fra a 1a-e (Musidowska-Persson, Alm et al. 2007) zu Fra a 1.01A-E umbenannt und die PR-10 Proteine Fra a 2 und 3 fortan als Fra a 1.02 und 1.03 bezeichnet (Muñoz, Hoffmann et al. 2010).

Im Genom des weiß-fruchtigen Genotyps 'Hawaii 4' konnten über einen *in silico* Vergleich der Proteinsequenzen 21 Isoformen der Allergenfamilie Fra a 1 identifiziert werden, welche ebenfalls in die PR-10 Proteinfamilie einzuordnen sind. Die Genexpression der drei Isoformen Fra a 1.01E, Fra a 1.02 und Fra a 1.03 wurde mittels einer relativen Genexpressionsanalyse in unterschiedlichen Gewebeteilen untersucht. *Fra a 1.01E* wird in allen Gewebeteilen exprimiert, aber das höchste Transkriptlevel liegt in der Wurzel vor. *Fra a 1.03* zeigt im Allgemeinen ein einheitliches Expressionsmuster, dennoch wird in den vollständig ausgebildeten Blüten eine dreifach höhere Expression des Gens *Fra a 1.03* gemessen.

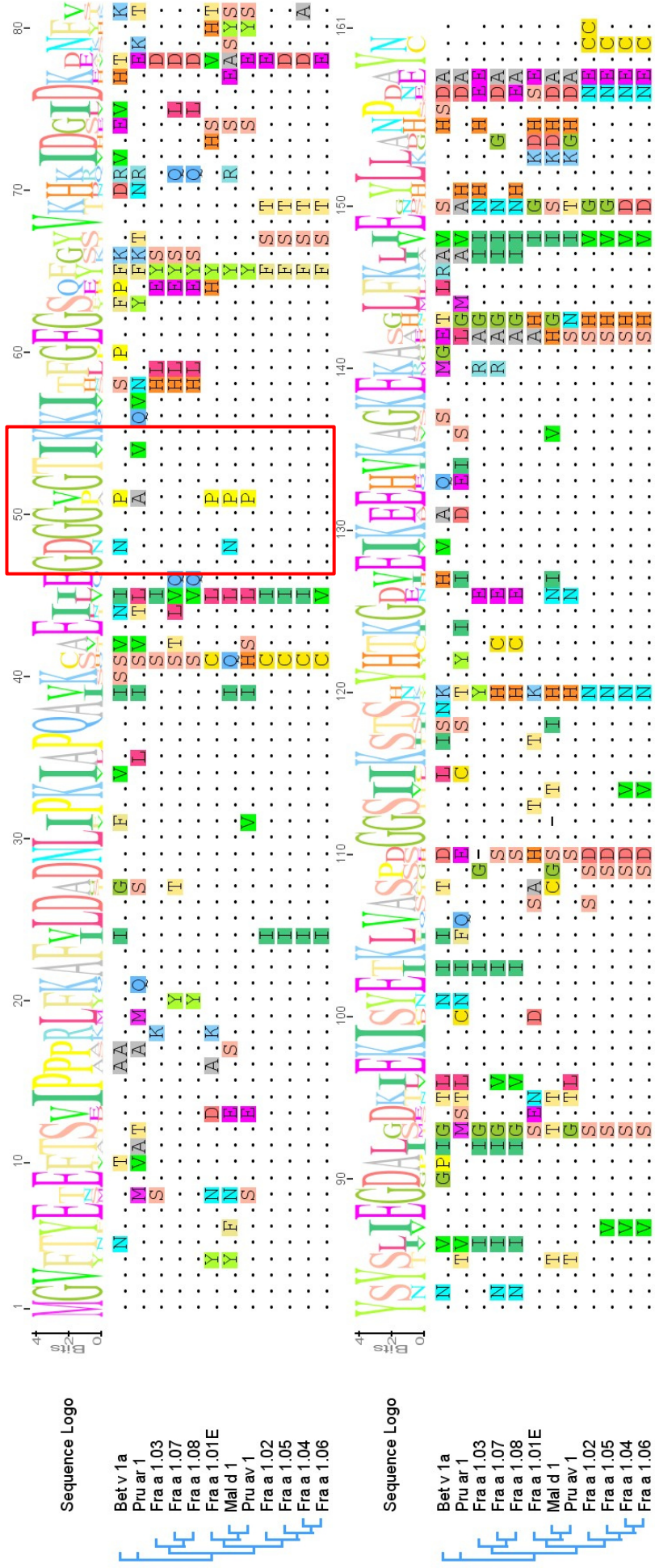


Abbildung 11 Proteinsequenzalignment von Fra a 1.01E-1.08, Bet v 1a, Mal d 1, Pru av 1 und Pru ar 1 (paarweise Identität: 73,3%). Die Proteinsequenzen haben das Motiv des Phosphat-Bindungs-Loops (P-Loop), welches sich von aa 47-55 erstreckt und das Sequenzmuster [GGXGTXK] aufweist gemeinsam (rot markierte Box; Munoz et al. 2010; Saraste et al. 1990). Legende der Symbole: Übereinstimmung der Nucleotide (.); große Sequenz-Logo-Buchstaben zeigen das gleiche Nucleotide in allen verglichenen Sequenzen an; kleine/kleinere Sequenz-Logo-Buchstaben zeigen unterschiedliche Nucleotide in den verglichenen Sequenzen an.

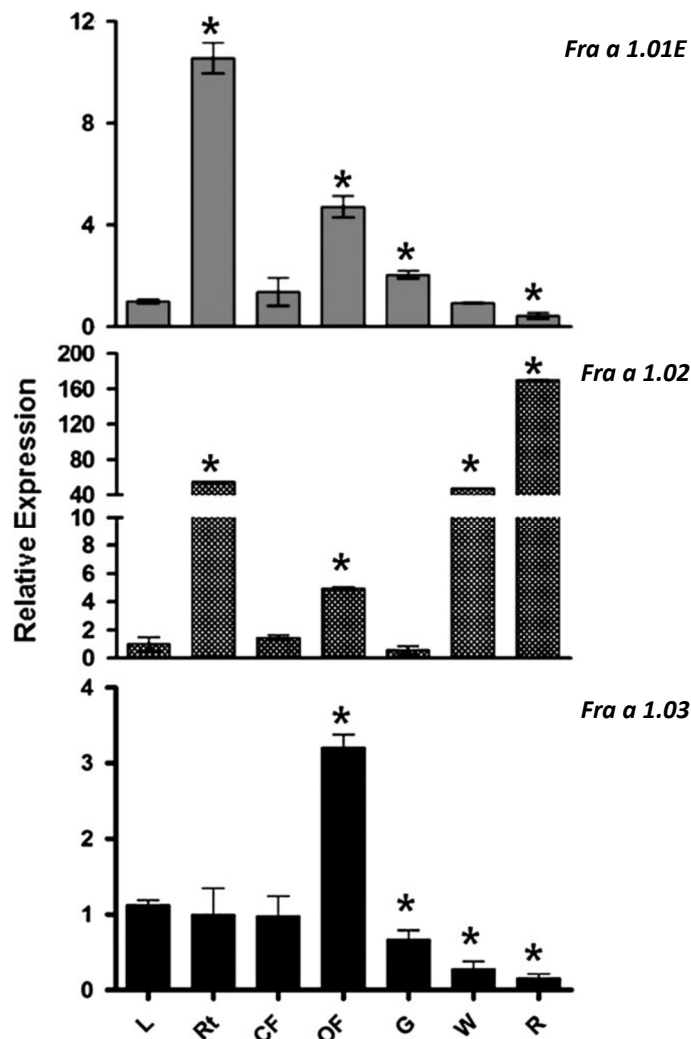


Abbildung 12 qRT-PCR Analyse der Expression von Fra a 1.01E, Fra a 1.02 und Fra a 1.03 in unterschiedlichen Geweben von *Fragaria xananassa* ((L) Blätter, (Rt) Wurzel, (CF) geschlossene Blüten, (OF) geöffnete Blüten, (G) grüne, (W) weiße, (R) rote Früchte; Munoz et al. 2010)

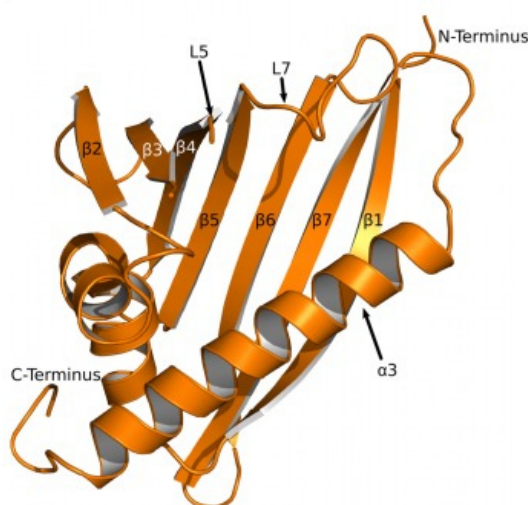


Abbildung 13 Tertiärstruktur der Erdbeerallegen-Isoform Fra a 1.01E (Casañal et al. 2013)

Im Gegensatz dazu ist der Transkriptgehalt von *Fra a 1.02* in den späten Stadien der Fruchtreifung am Höchsten. Es ist deutlich zu erkennen, dass alle drei Allergen-Isomere sehr unterschiedliche Expressionsmuster zeigen und nur die Expression von *Fra a 1.02* mit der Reife der Erdbeerfrucht korreliert (Abbildung 12) (Muñoz, Hoffmann et al. 2010). Obwohl die *Fra a 1.01E* Isoform als Hauptallergen von Erdbeerfrüchten postuliert wurde (Hjernø, Alm et al. 2006, Musidlowska-Persson, Alm et al. 2007), ist davon auszugehen, dass es sich bei *Fra a 1.02* möglicherweise um das gesuchte Haupt-Erdbeerallergen handelt. Die höchste Expression des Allergens liegt in der Frucht vor, welche von Allergikern verzehrt wird, und die daraufhin eine allergische Reaktion (OAS) erfahren (Muñoz, Hoffmann et al. 2010). Die drei Proteine *Fra a 1.01E/1.02/1.03* weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf. Die Übereinstimmung bei einem paarweisen Proteinsequenzalignment von *Fra a 1.01E* und *Fra a 1.03* jeweils mit *Fra a 1.02* beträgt 78,9% bzw. 80,1%. Die Sequenzähnlichkeit der drei Isoformen (*Fra a 1.01E/1.02/1.03*) zu *Bet v 1* liegt jeweils bei 54%, 58,4% und 59% (Muñoz, Hoffmann et al. 2010).

Bei einer weiteren relativen Genexpressionsanalyse von allen 21 Isoformen konnten weitere fünf *Fra a 1* Isoformen, *Fra a 1.04* bis *1.08*, welche auch in der reifen roten Frucht exprimiert werden, identifiziert werden (Besbes, Franz-Oberdorf et al. 2019).

Die kürzlich aufgeklärte Tertiärstruktur von *Fra a 1.01E* weist eine hohe Ähnlichkeit mit der Kristallstruktur des Haupt-Kirschenallergens *Pru av 1* und der Tertiärstruktur des Haupt-Birkenpollenallergens *Bet v 1* auf. Diese Ähnlichkeit wird bestätigt durch die hohe Proteinsequenzähnlichkeit von *Fra a 1.01E* mit *Pru av 1* von 79,4% und, wie bereits erwähnt, von *Fra a 1.10E* mit *Bet v 1* von 53,8%. Wie andere Proteine der *Bet v 1*-homologen Superfamilie weist auch *Fra a 1.01E* das hochkonservierte Glycin-reiche P-Loop Motiv bei den Aminosäuren 47–55 auf (Von Loetzen,

Schweimer et al. 2012). Es wird vermutet, dass der hochkonservierte P-Loop in Bet v 1-homologen Proteinen ein Epitop für IgE-Antikörper darstellt und somit für die Kreuzreaktivität zwischen den Proteinen der Bet v 1-Superfamilie verantwortlich sein könnte (Neudecker, Lehmann et al. 2003, Spangfort, Mirza et al. 2003). Die Struktur von Fra a 1.01E besteht, wie auch Bet v 1, aus einem siebensträngigen antiparallelen β -Faltblatt, das durch eine lange C-terminale α -Helix und eine kurze v-förmige α -Helix abgeschlossen wird. Dadurch entsteht eine sehr große hydrophobe Höhle von 2500 Å (Abbildung 13). Es wird vermutet, dass Fra a 1 in dieser großen hydrophoben Höhle sehr große Liganden binden kann (Von Loetzen, Schweimer et al. 2012). Des Weiteren wird vermutet, dass Fra a 1 Proteine in den Transport von Metaboliten des Flavonoidbiosyntheseweges von einem Enzym zum nächsten Enzym beteiligt sein könnten. Affinitätsbindungsuntersuchungen zwischen Fra a 1 und Intermediaten des Flavonoidbiosyntheseweges wie Quercetin 3-O-Glukuronid, Myricetin und (+)-Catechin unterstützen diese Hypothese basierend auf Dissoziationskonstanten (K_D) im niedrigen mikromolaren Bereich (Muñoz, Hoffmann et al. 2010, Casañal, Zander et al. 2013a). Weiterhin gelang die Strukturaufklärung eines Fra a 1.03-Catechin-Komplexes, welcher erste mechanistische Einblicke in die biologische Funktion von Fra a 1 Proteinen gibt, da sie vermutlich eine Rolle im Flavonoidbiosyntheseweg durch die Bindung an metabolische Zwischenprodukte spielen können (Casanal, Zander et al. 2013b).

In einer Erdbeer-cDNA-Bibliothek wurden neben den Erdbeerallergenen Fra a 1 aus der PR-10 Proteinfamilie weitere Gene identifiziert, welche anderen putativen Allergenfamilien wie den Lipid-Transfer-Proteinen (nsLTP, Fra a 3) und den Profilinen (Fra a 4) zugeordnet werden können (Zuidmeer, Salentijn et al. 2006). Die Sequenzähnlichkeit der beiden Proteine Fra a 1 und Fra a 4 beträgt 76,2 %. Fra a 3 weist eine Sequenzhomologie von 74% zu Mal d 3 auf (Karlsson, Alm et al. 2004). NsLTP-Proteine (*nonspecific lipid transfer protein*) werden wegen ihrer strukturellen Eigenschaften nicht nur in die PR-14 Proteinfamilie, sondern auch in die Prolamin Superfamilie eingeordnet (Breiteneder and Radauer 2004). Sie sind sehr resistent gegenüber extremen Temperatur- und pH-Wert-Änderungen. NsLTPs spielen nicht nur in der Pathogenabwehr eine wichtige Rolle, sondern einige nsLTPs haben zusätzlich auch eine antifungale und antimikrobielle Aktivität. Fra a 4 wurde in die Superfamilie der Profiline eingeordnet. Sie werden sehr leicht durch Hitze denaturiert oder im Gastrointestinaltrakt zerstört. Deshalb werden von Profilinen meist allergische Reaktionen hervorgerufen, welche zu den *oral allergy syndrom* (OAS) zu zählen sind. Die *in vitro* ermittelte Kreuzreaktivität von Fra a 4 konnte noch nicht auf den Patienten übertragen werden. Deshalb wurde die klinische Relevanz, Profiline zu Allergenen zu zählen, noch nicht abschließend geklärt (Laimer and Maghuly 2010).

Kürzlich wurde nachgewiesen, dass getrocknete Erdbeerfrüchte durch eine schonende thermale Behandlung im Ofen oder durch die Sonne nur einen geringfügig geringeren Fra a 1.02 Proteingehalt verglichen mit frischen Früchten aufwiesen. Eine Behandlung von rekombinanten Fra a 1.02 Proteinen länger als 10 Minuten bei 99°C führte hingegen zu einer Degradation des rekombinanten Fra a 1.02 Allergens (Kurze, Kock et al. 2018).

Mittels einer transienten RNAi-vermittelten Herabregulierung der Gene *Fra a 1.01E* und *Fra a 1.03* in Früchten von *F. xananassa* cv. Elsanta konnte ein reduzierter Gehalt an mRNA von *Fra a 1.01E*, *1.02* und *1.03* verzeichnet werden (Muñoz et al. 2010). Durch eine LC-UV-ESI-MSⁿ Analyse der transgen veränderten Erdbeeren wurde außerdem ein deutlich geringerer Gehalt an Anthocyanen wie Pelargonidin 3-O-Glukosid und den vorangehenden Metaboliten beobachtet. Dieses Resultat wurde durch den Phänotyp der *Fra a 1* reduzierten Erdbeerfrüchte bestätigt, welche weiße Regionen auf der Frucht aufwiesen. Dies ist durch die gleichzeitige Herabregulation der Enzyme Phenylalanin-Ammonium-Lyase (*FaPAL*) und Chalconsynthase (*FaCHS*), den wichtigen Schlüsselenzymen der Anthocyanbiosynthese, zu erklären. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Expression des Fra a 1 Allergens direkt mit der Flavonoidbiosynthese verbunden ist und somit das Allergen Fra a 1 eine biologische Funktion in der Pigmentbildung innehat (Hjernø, Alm et al. 2006, Hoffmann, Kalinowski et al. 2006, Griesser, Hoffmann et al. 2008a, Muñoz, Hoffmann et al. 2010). Ein weiterer Hinweis darauf, dass Fra a 1 eine Funktion in der Pigmentbildung in der Frucht ausführt, basiert darauf, dass eine natürliche weiß-fruchtige Erdbeervarietät *F. xananassa* '968603' von Allergikern toleriert wurde. Proteomanalysen zeigten, dass neben den Genen für *Fra a 1* auch Gene für Enzyme der

Anthocyanbiosynthese in diesem Genotyp mit weißen Früchten deutlich herunterreguliert worden waren (Hjernø, Alm et al. 2006). Drei weitere weiße Erdbeervarietäten – ‘976902’, ‘945501’ und ‘0W4’ – bestätigten die Ergebnisse, dass die Gene, welche für *Fra a 1* kodieren, herunterreguliert wurden. Es wurde aber auch beobachtet, dass die Menge an Erdbeerallergen durch unterschiedliche Wachstumsbedingungen innerhalb einer Varietät ebenso schwanken konnte wie zwischen zwei unterschiedlichen Erdbeersorten (Alm, Ekefjård et al. 2007).

2.4.3 *Fra a 1*-Assoziiertes Protein (FaAP)

Pühringer und Kollegen identifizierten 2003 das Protein *Mal d 1*-Assoziiertes Protein (MdAP) als Interaktionspartner von gleich zwei Isoformen des Haupt-Apfelallergens *Mal d 1* durch ein Hefe Zwei-

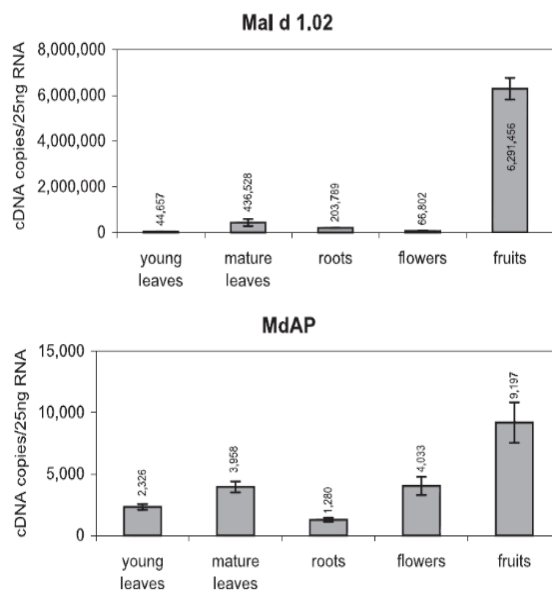


Abbildung 14 Vergleich der relativen Genexpression von *Mal d 1.02* und *MdAP* in unterschiedlichen Apfelorganen ((young leaves) junge Blätter, (mature leaves) alte Blätter, (roots) Wurzeln, (flowers) Blüten, (fruits) Früchte)

Gewebe. Die *MdAP* Transkriptgehalte waren jedoch deutlich niedriger als die der *Mal d 1* Mengen. Die Expressionsprofile von *MdAP* und *Mal d 1* sind somit direkt proportional zueinander (Puehringer, Zinoecker et al. 2003) (Abbildung 14).

2.5 Natürlich vorkommende weiß-fruchtige Genotypen

Die Gattung *Fragaria* innerhalb der Familie *Rosaceae* bietet eine biologische und genetische Vielfalt in Bezug auf rot-, gelb- und weiß-fruchtige, große und kleine, hocharomatische, leckere und weniger schmackhafte Sorten. Auch innerhalb der verschiedenen Erdbeerarten wie der kleinen aromatischen Walderdbeere *F. vesca*, der großfruchtigen Gartenerdbeere *F. xananassa*, *F. chiloensis* aber auch *F. nilgerrensis* (1.1.2) gibt es aufgrund des erhöhten Züchtungsaufwandes und wegen einer Vielzahl an natürlich vorkommenden Mutationen rote, gelbe und weiße reife Erdbeerfrüchte (Ulrich, Komes et al. 2007).

Auf der Suche nach Erdbeergenotypen mit einem niedrigen Allergengehalt wurde die proteomische Variation innerhalb und zwischen verschiedenen Sorten bestimmt (Alm, Ekefjård et al. 2007). Es wurden mehrere Proteine, welche homolog zu dem Haupt-Birkenpollenallergen Bet v 1 sind, nachgewiesen. Der Gesamt-Allergengehalt variierte aufgrund der Wachstumsbedingungen und war in einer weiß-fruchtigen Erdbeersorte niedriger als in einem anderen rot-fruchtigen Genotypen. Des Weiteren zeigte die Proteomanalyse auch, dass mehrere katalytisch aktive Proteine wie die Chalconsynthase (FaCHS), Flavanon 3-Hydroxylase (FaF3H) und die Dihydroflavonol-Reduktase (FaDFR) in deutlich reduziertem Transkriptlevel vorlagen. Diese Enzyme sind Bestandteil des Anthocyanbiosyntheseweges, der mehrere Verbindungen einschließlich Pelargonidin 3-O-Glukosid,

das Pigment welches hauptsächlich für die Rotfärbung der reifen roten Erdbeerfrüchte verantwortlich ist, produziert (Abbildung 9). Die reifen farblosen Früchte dieser untersuchten weiß-fruchtigen Sorte wurden von Personen, die unter einer Erdbeerallergie litten, toleriert. Nach weiteren Untersuchungen konnte diese weiß-fruchtige Sorte als praktisch frei vom Erdbeerallergen Fra a 1 bezeichnet werden (Hjernø, Alm et al. 2006, Griesser, Hoffmann et al. 2008a, Muñoz, Hoffmann et al. 2010). Doch die gelbe oder weiße Farbe einer reifen Erdbeere muss nicht zwingend auf ein geringes Expressionslevel von Fra a 1 zurückzuführen sein und somit eine hypoallergene Sorte darstellen. Die Gründe hierfür können vielfältig sein.

Die genetischen Ursachen hinter den verschiedenen Farben, Größen und Aromen der Erdbeerarten sind weitgehend unbekannt. Eine beeinträchtigte Expression oder Mutation von Strukturgenen, wie zum Beispiel bei dem Enzym Flavanon 3-Hydroxylase im Falle von *F. vesca* cv. Yellow Wonder (Deng and Davis 2001) (Abbildung 4), der Anthocyanidin-Glukosyltransferase im Falle von *F. chiloensis* subsp. *chiloensis* (Griesser, Hoffmann et al. 2008a, Griesser, Vitzthum et al. 2008b, Saud, Carbone et al. 2009, Salvatierra, Pimentel et al. 2010, Härtl, Denton et al. 2017) oder dem Transkriptionsfaktor FaMYB10 (Medina-Puche, Cumpido-Laso et al. 2013, Hawkins, Caruana et al. 2016) können für den Farbverlust verantwortlich sein (Hjernø, Alm et al. 2006, Griesser, Hoffmann et al. 2008a, Griesser, Vitzthum et al. 2008b, Muñoz, Hoffmann et al. 2010). Hohe Gehalte an Anthocyanen sind in roten Erdbeerfrüchten vorhanden, jedoch nicht in gelben und weißen Früchten (Urrutia, Schwab et al. 2016). Im Falle von *F. vesca* cv. Yellow Wonder wurde eine Kosegregation zwischen dem Flavonoidbiosynthesegen Flavanon 3-Hydroxylase (F3H) und dem Locus c (gelbe Frucht) beobachtet und führte zu der Hypothese, dass F3H ein Kandidatengen für den Locus c sein könnte (Deng and Davis 2001, Slovin, Schmitt et al. 2009).

3. Verwendete Methoden

3.1 Allergen-induzierter Basophilen Aktivierungstest

Um das mögliche kreuzreaktive allergene Potential rekombinanter Fra a 1 Proteine nachzuweisen, wurde ein Basophilen Aktivierungstest (BAT) durchgeführt. Ein BAT kann bei einer IgE-vermittelten Reaktion der Typ-I-Allergien eingesetzt werden. Bei einem Basophilen Aktivierungstest wird überprüft, ob IgE-abhängig eine Aktivierung von basophilen Granulozyten *in vitro* möglich ist. Basophile Granulozyten im Vollblut von Birkenpollen-Allergieklienten werden direkt mit den rekombinanten Allergenen inkubiert und die Hochregulation von speziellen Aktivierungsmarkern (CD63 und CCR3) auf den basophilen Granulozyten wird mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die nach Allergenstimulation exprimierten Oberflächenmarker der basophilen Granulozyten dienen als indirektes Maß für zellulär gebundenes spezifisches IgE. Mit Hilfe des Kits FlowCAST® von BÜHLMANN Laboratories wurde die allergische Reaktion *in vitro* stimuliert und die Aktivierungsmarker CD63 und CCR3 jeweils mit den fluoreszierenden Antikörpern Anti-CD63-FITC bzw. Anti-CCR3-PE markiert, welche anschließend durchflusszytometrisch gemessen werden konnten. Die ermittelte Basophilenaktivierung wird in „Prozent aktivierter Basophilen“ (% CD63+) angegeben. Der Oberflächenmarker CD63 ist Bestandteil der Granulamembranen und wird nach IgE-Rezeptoraggregation hochreguliert. Jedoch ist CD63 kein basophilen-spezifischer Marker, deshalb muss ein weiterer Oberflächenmarker, der Chemokinrezeptor 3 (CCR3), parallel mit analysiert werden (Valent, Hauswirth et al. 2004, Kaul, Lüttkopf et al. 2007, Eberlein, Suarez et al. 2010, Caubet and Sampson 2012). Neben Positiv- und Negativkontrollen wird auch eine nicht-sensibilisierte Kontrollgruppe mitgeführt und jeweils identisch zu der sensibilisierten Patientengruppe behandelt. Werden Lebensmittelallergene getestet, muss das Verhältnis von positiven basophilen Granulozyten zu allen gezählten basophilen Granulozyten bei 15% oder höher liegen, um von einer allergischen Reaktion sprechen zu können.

Der BAT ist ein hochempfindliches und spezifisches *in vitro* Verfahren zur Detektion von Spuren funktionell aktiver Nahrungsmittelallergene und kann zum Vergleich des allergenen Potentials von Proteinen aber auch zum Beispiel zum Nachweis von Spuren von Nahrungsmittelallergenen in Nahrungsmitteln angewendet werden (Eberlein, Suarez et al. 2010).

Der Basophilen Aktivierungstest mittels Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit als zelluläre Studie zur *in vitro* Diagnostik von IgE-vermittelten allergischen Reaktionen eingesetzt.

3.2 Protein-Protein Interaktionsstudie: Hefe Zwei-Hybrid Analyse (Y2H)

Mittels des biochemischen Hefe Zwei-Hybrid (Y2H) Systems wurde die Protein-Protein-Interaktion zwischen den drei Fra a 1 Isoformen – Fra a 1.01E, Fra a 1.02 und Fra a 1.03 – und dem möglichen Interaktionspartner *Fra a 1*-Assoziiertes Protein (FaAP) *in vivo* untersucht.

Bei der Y2H Analyse, welche in *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt wird, wird der Transkriptionsfaktor GAL4 herangezogen. Der GAL4 Transkriptionsfaktor besteht aus zwei Domänen. Eine Domäne bindet an DNA und wird GAL4-DNA-Bindedomäne (GBD) genannt. Die zweite GAL4-Aktivierungsdomäne (GAD) aktiviert die Transkription. Normalerweise befinden sich beide Domänen auf derselben Polypeptidkette. Sie sind aber auch aktiv, wenn die beiden Domänen durch zwei unterschiedliche Proteine, welche miteinander interagieren, zusammengebracht werden. Hierfür müssen zwei Expressionsvektoren generiert werden, die für die Fusionsproteine kodieren, welche aus den potenziell interagierenden Proteinen, jeweils mit GBD bzw. GAD bestehen. Das mit der DNA-Bindedomäne fusionierte Protein wird auch Köderprotein und das mit der Aktivierungsdomäne fusionierte zweite Protein als Beuteprotein bezeichnet. Die beiden Expressionsvektoren werden in einen Hefestamm transformiert, welcher selbst nicht in der Lage ist, den Transkriptionsfaktor GAL4 zu erzeugen und gleichzeitig Reportergene enthält. Die Reportergene haben gemein, dass ihnen eine oder mehrere Bindestellen für den GAL4-Transkriptionsfaktor vorgeschaltet sind. Sollten die Hefezellen nicht in der Lage sein den GAL4 Transkriptionsfaktor zu erzeugen, dann kann die semi-essenzielle proteinogene α -Aminosäure Histidin nicht gebildet werden und die Hefezellen können auf Minimalmedium nicht wachsen.

Eine positive Interaktion im Y2H Ansatz kann somit beobachtet werden, wenn die Hefezelle auf Minimalmedium wachsen kann. Dieses Wachstum impliziert, dass es zu einer Interaktion von Köder- und Beuteprotein kam, welche wiederum zu einer funktionellen Rekonstitution des GAL4 Transkriptionsfaktor und einer darauffolgenden Expression des Reportergens, des Enzyms zur Synthese von Histidin, zur Folge hatte (Katsiarimpa, Anzenberger et al. 2011, Maier, Maier et al. 2012, Worsack, Grossmann et al. 2012).

3.3 Protein-Protein Interaktionsstudie: „Time-resolved DNA switching“ Analyse

Bei der neuartigen „time-resolved DNA switching“ Analyse werden *in vitro* molekulare Wechselwirkungen an einem Biochip untersucht, welcher die Assoziation bzw. die Dissoziation von gelösten möglichen Interaktionspartnern an bzw. weg von der oberflächenimmobilisierten 48-x-DNA bestimmt. Auf diese Weise kann die molekulare Dynamik von Proteinen analysiert werden.

Kurze, doppelsträngige 48-x-DNA-Nanolevers wurden auf einer Gold-Mikroelektrode auf einem Biochip in den jeweils einzeln ansteuerbaren Strömungskanälen immobilisiert. Ein kovalent gebundener Fluoreszenzfarbstoff, der an das entgegengesetzte Ende der DNA gebunden ist, wird eingesetzt, um die Orientierung der DNA-Hebel in Bezug zur Biochip-Oberfläche zu messen. Die an die Mikroelektrode angelegte Spannung, welche in μs wechselt, führt zu einer Hebelbewegung der immobilisierten DNA zwischen einem stehenden und einem liegenden Zustand, je nach angelegter Spannung. Da das Fluoreszenzsignal, wenn sich der DNA-Hebel zur Goldoberfläche der Mikroelektrode neigt, gequencht wird, kann die Bewegung der DNA durch eine zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung in Echtzeit überwacht werden. Somit kann die Bewegung der DNA in einem Fluoreszenz-Histogramm grafisch dargestellt werden.

Wenn das Fängermolekül an das obere Ende der DNA gebunden ist, können spezifisch Zielproteine aus der Lösung, welche über den Biochip gespült werden, an das Fängermolekül binden. Als Folge des erhöhten hydrodynamischen Widerstandes verlangsamt sich die Bewegung des DNA-Hebels als Funktion des hydrodynamischen Durchmessers des Proteins. Bei einer Protein-Protein-Wechselwirkung mit einem möglichen Interaktionspartner, welcher in Puffer über den Biochip gespült wird, verlangsamt sich die Bewegung weiter. Dies ermöglicht die Ermittlung der Bindungskinetik in Echtzeit und die Berechnung der Assoziations- (k_{on}) und Dissoziationsraten (k_{off}) und der Dissoziationskonstante (K_D ; Abbildung 15) (Knezevic, Langer et al. 2012, Langer, Hampel et al. 2013).

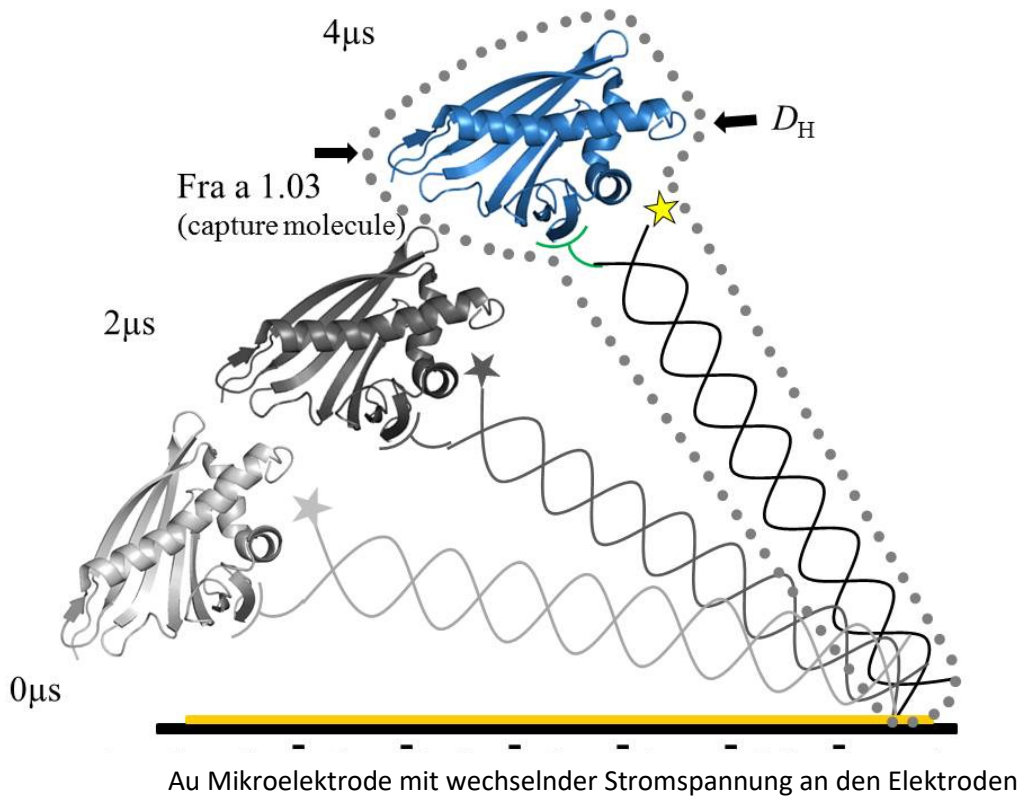


Abbildung 15 Schematische Darstellung eines DNA-Einzelstranges, welches kovalent mit dem Fängermolekül, NTA3 (grün) verbunden ist und über das Fängermolekül mit dem Protein Fra a 1.03 (blau) konjugiert ist. An dem zweiten DNA-Einzelstrang ist das Fluoreszenzmolekül (gelber Stern) gebunden. Die gepunktete Linie repräsentiert die „Lollipop“-Silhouette zur Berechnung des hydrodynamischen Durchmessers (D_H). (capture molecule: Fängermolekül)

4. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es weitere Untersuchungen zur physiologischen Funktion der Erdbeerallergene Fra a 1 aus der Proteinfamilie PR-10 durchzuführen und Möglichkeiten für die gezielte Züchtung hypoallergener Erdbeersorten aufzuzeigen.

Die rote reife Erdbeere ist als Lebensmittel sehr beliebt und enthält zahlreiche entzündungshemmende, antioxidative, antikarzinogene, antiproliferative und weitere gesundheitsfördernde Inhaltsstoffe (Forbes-Hernandez, Gasparrini et al. 2016, Joseph, Edirisinghe et al. 2016). In Anbetracht der Tatsache, dass Erdbeerallergiker an diesen gesundheitsfördernden Wirkungen nicht partizipieren können, ist die Identifizierung des Haupt-Erdbeerallergens und die klassische selektive Züchtung von hypoallergenen Erdbeersorten unter Zuhilfenahme von Markern ein wichtiger Schritt (Mazzoni, Perez-Lopez et al. 2016).

Im Genom der Gattung *Fragaria* wurden 21 Fra a 1 Isoformen identifiziert. Acht dieser Isoformen werden überwiegend in der reifen Frucht exprimiert, welche konsumiert wird. Die Isoform Fra a 1.01E wurde bereits als das Hauptallergen der Erdbeere postuliert (Karlsson, Alm et al. 2004, Hjernø, Alm et al. 2006, Musidowska-Persson, Alm et al. 2007). Weitere Genexpressionsanalysen legten jedoch die Vermutung nahe, dass Fra a 1.01E, welches hauptsächlich in der Wurzel exprimiert wird, nicht das Hauptallergen der Erdbeere sein kann (Muñoz, Hoffmann et al. 2010). Um nun das Haupt-Erdbeerallergen zu identifizieren, sollte das kreuzreaktive allergene Potential der acht rekombinanten Fra a 1 Isoformen an Vollblut von Birkenpollenallergikern mittels des Basophilen Aktivierungstests untersucht werden. Der BAT mit rekombinanten Proteinen wird als wertvolles Werkzeug für die Bestimmung der für die Sensibilisierung gegenüber Nahrungsmittel verantwortlichen Proteine angesehen (Eberlein, Suarez et al. 2010).

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass ein natürlich vorkommender, weiß-fruchtiger Erdbeergenotyp von Erdbeerallergikern toleriert wurde. Die Proteomanalyse dieser weiß-fruchtigen

Varietät zeigte, dass die Erdbeerallergene Fra a 1 und auch wichtige Enzyme des Anthocyanbiosyntheseweges herunterreguliert waren (Hjernø, Alm et al. 2006). Diese Erkenntnis wurde weiter bestärkt durch die Ergebnisse einer RNAi-vermittelten Herabregulation des Gens *FaCHS*, welches eine parallele Herabregulation von Fra a 1 Isoformen nach sich zog. Die resultierende Frucht der RNAi-vermittelten Herabregulierung war weiß-fruchtig (Muñoz, Hoffmann et al. 2010).

Auf der Suche nach weiteren hypoallergenen Erdbeersorten sollte deshalb eine Untersuchung von 51 weiß-fruchtigen Erdbeergenotypen durchgeführt werden. Zunächst sollten diese 51 Genotypen auf ihren Gehalt an Fra a 1 Proteinen mittels einer Western Blot Analyse untersucht werden. Unter anderem sollte auch die Frage geklärt werden, ob alle weiß-fruchtigen Erdbeersorten ein geringes allergenes Potential aufweisen.

Die Erdbeergenotypen mit einem geringen Gehalt an Fra a 1 Proteinen sollten weiterhin in einem Basophilen Aktivierungstest (BAT) zur genaueren Bestimmung des allergenen Potentials untersucht werden. Der BAT sollte analog der Untersuchung der rekombinanten Fra a 1 Proteine durchgeführt werden, nur dass in diesem Experiment der allergene Stimulator ein phenolischer Extrakt aus vorrangig weiß-fruchtigen Erdbeergenotypen war. Ziel war es in diesem Teil der Arbeit die Hypo- bzw. Hyperallergenität einer natürlich weiß vorkommenden Erdbeersorte nachzuweisen.

Weiterhin sollten physiologische Funktionen des Erdbeerallergens Fra a 1 in der Pflanze beleuchtet werden. Ein möglicher Protein-Protein-Interaktionspartner des Erdbeerallergens Fra a 1 sollte durch einen Hefe Zwei-Hybrid Assay und die neuartige „time-resolved DNA switching“ Analyse (Langer, Hampel et al. 2013) gezeigt werden. Im Apfel wurde bereits das Mal d 1-Assoziierte Protein (MdAP) als möglicher Interaktionspartner des homologen Mal d 1 Proteins postuliert (Puehringer, Zinoecker et al. 2003). Das orthologe Protein, Fra a 1-Assoziierte Protein (FaAP), konnte in der Erdbeere nachgewiesen werden und sollte als Interaktionspartner von drei Fra a 1 Isoformen verifiziert werden.

Kenntnisse über die Eigenschaften von Fra a 1 Proteinen könnten weitere Hinweise auf deren mögliche Funktionen im Flavonoidbiosyntheseweg liefern. Zum Beispiel könnten die Proteine den Transport von Sekundärmetaboliten in Vakuolen und Vesikeln oder den Transport von Intermediaten von einem Enzym zum nächsten vermitteln. Weiterhin kann das Wissen über die Proteinfunktionen die gezielte Züchtung hypoallergener Erdbeersorten ermöglichen.

II Material und Methoden

1. Material

1.1 Pflanzenmaterial

1.1.1 Erdbeerarten

Reife Erdbeerfrüchte (40 DPA; I.1.3) verschiedener Arten und kultivierter Sorten (Tabelle 1) wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und abhängig von den jeweiligen Experimenten bei -20°C bzw. -80°C gelagert. Die Erdbeerpflanzen wurden im Gewächshauszentrum Dürnast unter Langtagbedingungen (16 h/8 h, Hell- Dunkelperiode, ca. 21°C) mit Hilfe eines Anstau-Bewässerungssystems in Pflanzenbodenmaterial gezüchtet. Die Pflanzen wurden unter optimierten Bedingungen mit Wasser, Makro- und Mikronährstoffe versorgt.

Tabelle 1 Liste der untersuchten Erdbeerarten und Sorten

Nr.	Gattung und Art	Kultivierte Sorte/ Züchtungsprotokoll-Nr.	Quelle	Pflanzen- vermehrung
1	<i>F. xananassa</i>	cv. Elsanta	Kraege Beerenobst, Telgte, DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
2	<i>F. xananassa</i>	cv. Mara des Bois	Kraege Beerenobst, Telgte, DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
3	<i>F. xananassa</i>	`P-100693`	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
4	<i>F. xananassa</i>	`P-100693`	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (Feld), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
5	<i>F. xananassa</i>	cv. Anablanca	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
6	<i>F. xananassa</i>	cv. White Pine	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
7	<i>F. xananassa</i>	cv. White Dream	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
8	<i>F. xananassa</i>	cv. Weiße Ananas	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
9	<i>F. xananassa</i>	`P-90000`	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
10	<i>F. xananassa</i>	`P-90000`	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (Feld), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
11	<i>F. xananassa</i>	`P-100120`	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
12	<i>F. xananassa</i>	`P-100121`	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL

13	<i>F. xananassa</i>	`P-100122`	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
14	<i>F. xananassa</i>	`P-100123`	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
15	<i>F. xananassa</i>	`P-100125`	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
16	<i>F. xananassa</i>	`P-100675`	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
17	<i>F. xananassa</i>	`P-100677`	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
18	<i>F. xananassa</i>	`P-100677`	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (Feld), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
19	<i>F. xananassa</i>	`P-100678`	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
20	<i>F. xananassa</i>	`P-100691`	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
21	<i>F. xananassa</i>	`P-100695`	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
22	<i>F. xananassa</i>	`P-100696`	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
23	<i>F. vesca</i>	rot-fruchtiger Wildtyp (WT) (unbeschriebene Sorte)	GWH Dürnast, Freising, DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
24	<i>F. vesca</i>	`Hawaii 4`	Denton, Texas, USA (Shulaev, Sargent et al. 2011)	GWH, Dürnast, Freising; DL
25	<i>F. vesca</i>	cv. Yellow Wonder	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
26	<i>F. vesca</i>	`185`	Universität von Malaga, Spanien	GWH, Dürnast, Freising; DL
27	<i>F. vesca</i>	cv. Red Wonder	Universität von Malaga, Spanien	GWH, Dürnast, Freising; DL
28	<i>F. vesca</i>	`Blanca`	Universität von Talca, Chile	GWH, Dürnast, Freising; DL
29	<i>F. vesca</i>	`Reina de los Vallas Roja`	Universität von Talca, Chile	GWH, Dürnast, Freising; DL
30	<i>F. vesca</i>	`Moritzburg`	Julius-Kühn-Institut, Dresden, DL	GWH, Dürnast, Freising; DL

31	<i>F. vesca</i>	`forma alba St. 08/101´	Julius-Kühn-Institut, Dresden, DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
32	<i>F. vesca</i>	`forma alba S. Queen ferry´	Julius-Kühn-Institut, Dresden, DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
33	<i>F. vesca</i>	`156´	Universität von Malaga, Spanien	GWH, Dürnast, Freising; DL
34	<i>F. vesca</i>	`285´	Universität von Malaga, Spanien	GWH, Dürnast, Freising; DL
35	<i>F. vesca</i>	`596´	Universität von Malaga, Spanien	GWH, Dürnast, Freising; DL
36	<i>F. vesca</i>	`175´	Universität von Malaga, Spanien	GWH, Dürnast, Freising; DL
37	<i>F. vesca</i>	`412´	Universität von Malaga, Spanien	GWH, Dürnast, Freising; DL
38	<i>F. vesca</i>	`425´	Universität von Malaga, Spanien	GWH, Dürnast, Freising; DL
39	<i>F. nilgerrensis</i>	`Dickore 1´	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
40	<i>F. nilgerrensis</i>	`Dickore 2´	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
41	<i>F. nilgerrensis</i>	`Mt. Omei 1´	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
42	<i>F. nilgerrensis</i>	`Mt. Omei 2´	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
43	<i>F. nilgerrensis</i>	`Yunnan 3´	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
44	<i>F. nilgerrensis</i>	`Yunnan 4´	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
45	<i>F. nilgerrensis</i>	`St. 94/04-1´	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
46	<i>F. nilgerrensis</i>	`St. 98/2-1´	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
47	<i>F. nilgerrensis</i>	`Leigong 1´	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
48	<i>F. nilgerrensis</i>	`Leigong 2´	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
49	<i>F. nilgerrensis</i>	`Apricot Chinois´	Hansabred GmbH & Co. KG, Dresden (GWH), DL	GWH, Dürnast, Freising; DL

50	<i>F. nilgerrensis</i>	'77'	Julius-Kühn-Institut, Dresden, DL	GWH, Dürnast, Freising; DL
51	<i>F. nilgerrensis</i>	'80'	Julius-Kühn-Institut, Dresden, DL	GWH, Dürnast, Freising; DL

1.2 Heterologe Proteinexpression

Die Extraktion der Gesamt-RNA, Klonierung, heterologe Expression und Analyse der Proteine, die in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt sind, wurden, wie in den Abschnitten II.4.1.1 bis II.4.1.26 beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 2 Nomenklatur und Nukleotidinformationen über die untersuchten Gene

Genname	Gen ID <i>Fragaria</i> Genome (Shulaev, Sargent et al. 2011)	Genname <i>F. vesca</i> (Hyun and Kim 2011)	EMBL/GenBank Eintragungsnr.	ORF (nt)
<i>Fra a 1.01E</i>	gene07081	<i>Fra v 1.10</i>	AM236319	483
<i>Fra a 1.02</i>	gene07086	<i>Fra v 1.05A</i>	GQ148818	483
<i>Fra a 1.03</i>	gene07082	<i>Fra v 1.08</i>	GQ148819	480
<i>Fra a 1.04</i>	gene05122	<i>Fra v 1.06B</i>	KJ507735	483
<i>Fra a 1.05</i>	gene07065	<i>Fra v 1.05B</i>	KJ507736	483
<i>Fra a 1.06</i>	gene07088	<i>Fra v 1.06A</i>	KJ507737	483
<i>Fra a 1.07</i>	gene05123	<i>Fra v 1.01</i>	KJ507738	483
<i>Fra a 1.08</i>	gene07064	<i>Fra v 1.02</i>	KJ507739	483
<i>Bet v 1a</i>	/	/	Z80099.1	483
<i>Mal d 1</i>	/	/	AJ417551	480
<i>RCAR8</i>	/	/	AY052251.1	612
<i>FaAP</i>	gene18255	FvAP	KF785812	579
<i>FaAP-eGFP</i>	gene18255-/	FvAP-/	KF785812-KM396758.1	1311
<i>MdAP</i>	/	/	AAD21467	573
<i>AtAP</i>	/	/	AT2G35900	579
<i>eGFP</i>	/	/	KM396758.1	714
<i>FaATG8C</i>	gene03347	<i>FvATG8C</i>	XM_011462740.1	360
<i>ABI2</i>	/	/	Y08965.1	1270

Tabelle 3 Informationen über die untersuchten Proteine

Proteinname	Länge (AS)	pI/MG (kDa)	Paarweise Protein-Sequenzähnlichkeit (%; Referenz: Fra a 1.02)	Paarweise Protein-Sequenzähnlichkeit (%; Referenz: Bet v 1)
Fra a 1.01E	161	6,6/17,8	78,9	54
Fra a 1.02	161	5,1/17,6	Referenz	58,4
Fra a 1.03	160	5,6/17,5	80,1	59
Fra a 1.04	161	4,9/17,5	95,7	58,4
Fra a 1.05	161	5,0/17,5	97,5	59
Fra a 1.06	161	4,9/17,5	96,3	57,8
Fra a 1.07	161	5,6/17,6	74,5	59,6
Fra a 1.08	161	5,9/17,5	77	59
Bet v 1a	161	5,3/17,6	58,4	Referenz
Mal d 1	160	5,9/17,7	71,4	56,5
RCAR8	203	6,4/22,7	21,2	37,5
FaAP	193	4,5/21,5	/	/
FaAP-eGFP	437	4,9/49,0	/	/
MdAP	191	4,5/21,2	/	/
AtAP	193	4,7/21,2	/	/
eGFP	239	5,8/27,5	/	/
FaATG8C	120	9,3/13,7	/	/
ABI2	423	6,3/46,3	/	/

1.3 Testpersonen und Kontrollgruppen

Für den Basophilen Aktivierungstest (BAT) wurden acht Patienten (sieben Frauen, ein Mann, 24-60 Jahre, Durchschnittsalter $41,9 \pm 33$ Jahre) mit bekannter Typ-I-Allergie gegen Birkenpollen und zwei gesunde Kontrollpersonen ohne Allergieerkrankung (zwei Frauen, 32-33 Jahre, Durchschnittsalter $32,5 \pm 2,2$ Jahre) ausgewählt. Alle atopischen Patienten zeigten einen positiven Skin-Prick-Test auf Birkenpollen und Birkenpollen-spezifisches Serum-IgE (Klasse ≥ 3 , Tabelle 4). Alle Patienten hatten mindestens 14 Tage vor der Blutabnahme die Medikamente gegen Birkenpollenallergie abgesetzt. Die Probanden der Kontrollgruppe zeigten einen Gesamt-IgE-Spiegel von $<0,1$ kU/L und kein spezifisches Serum-IgE (Klasse 0) für Birkenpollen (Tabelle 4). Die Lösungen für den Skin-Prick-Test für Bet v 1a und den Erdbeerextrakt waren im Handel erhältlich (II.1.9, Tabelle 5).

Die Basophilen Aktivierungstests wurden außerhalb der Birkenpollensaison durchgeführt, welche in München vom 4. April bis 27. Mai 2013 andauerte. Die Daten wurden im Februar, März und Juni 2013 erhoben. Die Ethikkommission der Technischen Universität München hat die Studie genehmigt. Alle Probanden wurden erst nach unterschriebener schriftlicher Einverständniserklärung in die Studie aufgenommen.

Bei dem Skin-Prick-Test entstehen als allergische Reaktionen Quaddeln (Wheal (W)) und ein Rötungshof (Flare (F)). Die Ablesung erfolgt nach 15 bis 20 Minuten. Als positive Testreaktion und somit als positive allergische Reaktion, gilt ein mittlerer Quaddel-Durchmesser von ≥ 3 mm.

Tabelle 4 Klinische und biologische Charakteristika der atopischen und nicht-atopischen Probanden

Testperson	Geschlecht	Alter	Klinische Reaktion gegen Allergene	CAP Birke [kU/L]
Atopische Gruppe				
I	w	52	Birke, Katze, <i>Phleum pratense</i>	71,2; Klasse 5
II	w	60	Birke, Erle	13,0; Klasse 3
III	m	34	Birke, Apfel, <i>Phleum pratense</i> , Katze, <i>D. farinae</i>	45,0; Klasse 4
IV	w	55	Birke, Haselnuss, Erle	51,3; Klasse 4
V	w	49	Birke, Apfel, <i>Phleum pratense</i>	70,9; Klasse 5
VI	w	24	Birke, Apfel, Erdbeere, Tomate	16,3; Klasse 3
VII	w	28	Birke, Haselnuss, Apfel, <i>D. farinae</i>	>100; Klasse 6
VIII	w	33	Birke, Haselnuss, Eiche, Erle, Haselnuss, Apfel, Pfirsich, Pflaume, Erdbeere	10,8; Klasse 3
Nicht-atopische Gruppe				
I	w	32	/	0,0; Klasse 0
II	w	33	/	0,0; Klasse 0

Tabelle 5 Klinische Charakteristika der atopischen und nicht-atopischen Probanden

Testperson	CAP Erdbeere [kU/L]	SPT Erdbeere (II.1.9; W/F in mm)	SPT <i>F. vesca</i> Extrakt (II.4.2.1; W/F in mm)	SPT <i>F. xananassa</i> cv. Mara des Bois Extrakt (II.4.2.1; W/F in mm)	SPT <i>F. xananassa</i> cv. Elsanta Extrakt (II.4.2.1; W/F in mm)
Atopische Gruppe					
I	0,11 Klasse 0	0/0	0/0	2/3	3/9
II	0,0 Klasse 0	0/0	1/1	2/10	4/30
III	0,11 Klasse 0	0/0	2/3	0/0	3/3
IV	0,18 Klasse 0	0/0	2/5	6/25	4/25
V	6,5 Klasse 3	0/0	1/1	0/0	0/0
VI	0,16	0/0	2/2	3/10	2/2

VII	Klasse 0 0,50	0/0	0/1	3/12	3/10
VIII	Klasse 1 0,01	0/0	2/3	4/5	3/5
Nicht-atopische Gruppe	Klasse 0				
I	0,02	0/0	0/0	0/0	0/0
II	Klasse 0 0,0	0/0	0/0	0/0	0/0

1.4 Chemikalien

Alle Chemikalien, Lösungsmittel und Referenzsubstanzen wurden von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Fluka (München, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), J. T. Baker (Deventer, Niederlande) oder Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) erworben. Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien entsprachen, soweit nicht anders in Tabelle 6 vermerkt, p.A. Qualität.

Tabelle 6 Chemikalienliste

Chemikalie	Lieferant
Ammoniumpersulfat >98% (APS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (0,1 mM)	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
FACS Flow™ Puffer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Laemmlis Probenpuffer	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Natriumhydroxid	Hanns Nierle, Freising, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktailtabletten	Roche, Penzberg, Deutschland
Stickstoff, flüssig	Linde, München, Deutschland

Reinstwasser wurde durch das Wasserbehandlungssystem von Purelab Classic (Elga, Celle, Deutschland) hergestellt.

1.5 Bakterien- und Hefestämme

Die in Tabelle 7 aufgelisteten Bakterien- und Hefestämme wurden verwendet.

Tabelle 7 Bakterien- und Hefestämme

Stamm	Lieferant
<i>Escherichia coli</i> : NEB 10-β chemo-kompetent <i>E. coli</i> (High efficiency) C3019H Genotyp: <i>araD139Δ (ara,leu) 7697 fhuA lacX74 galK16 galE15 mcrAφ80d (lacZΔM15) recA1 relA1 endA1 nupG rpsL rph spoT1Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	New England Biolabs (NEB), Frankfurt, Deutschland
<i>Escherichia coli</i> : BL21 (DE3) pLysS chemo-kompetent <i>E. coli</i> Genotyp: <i>F ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysSRARE (Cm^R)</i>	Novagen, Darmstadt, Deutschland
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> : Y190 System: GAL4 2H-2	CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA, USA

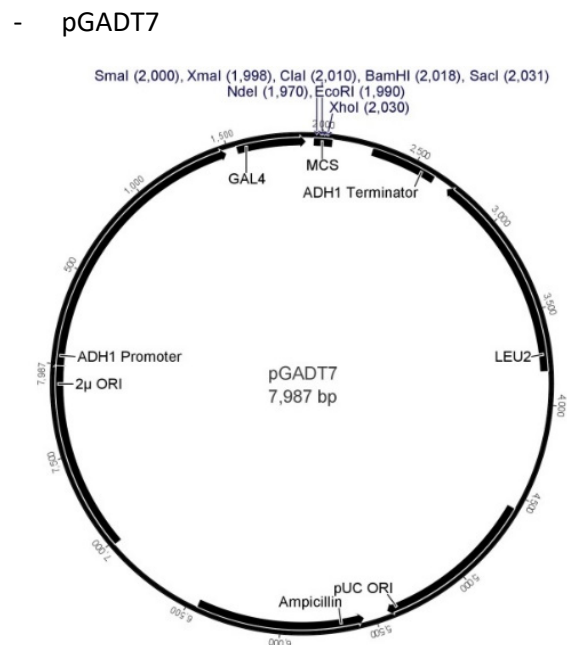
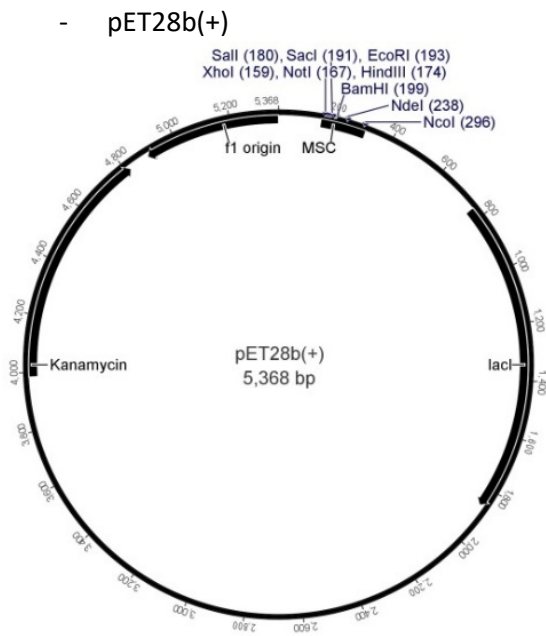
Genotyp: *MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, HIS3, lacZ, MEL1 trp1, leu2* (Flick and Johnston 1990)
trp1-901, leu2-3, 112, gal4D, gal80D, cyhr2, cyhr2 (Flick and Johnston 1990)
LYS2 :: GAL1UAS-HIS3TATA-HIS3, MEL1
URA3 :: GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ

1.6 Vektoren

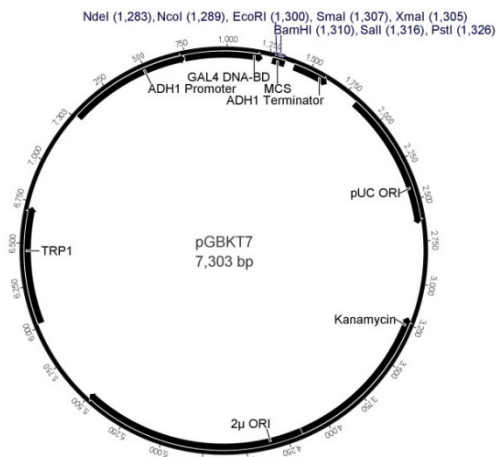
Die in Tabelle 8 aufgelisteten Vektoren wurden für die Klonierung und Expression des „genes of interest“ (GOI) eingesetzt.

Tabelle 8 Vektorinformationen

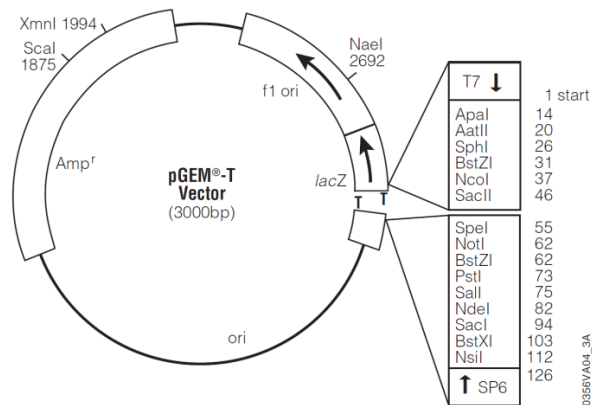
Vektor	Selektionsmarker	Sequenzierprimer	Lieferant
pET28b(+)	Kanamycin	T7, T7 term	Merck Millipore (Novagen), Schwalbach, Deutschland
pGADT7	Ampicillin/Leucin	T7, Gal4 AD	CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA, USA (Bartel, Roecklein et al. 1996)
pGBKT7	Kanamycin/Tryptophan	T7, Gal4 BD	CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA, USA
pGEM [®] -T easy	Ampicillin	T7, SP6	Promega, Madison, WI, USA
pQE70	Kanamycin	pQE for, pQE rev	Qiagen, Hilden, Deutschland
pYES2	Ampicillin/Uracil	Spezifische Primer	Life technologies, Darmstadt, Deutschland



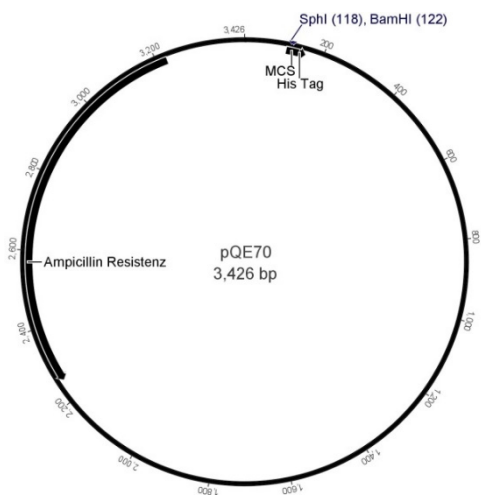
- pGBKT7



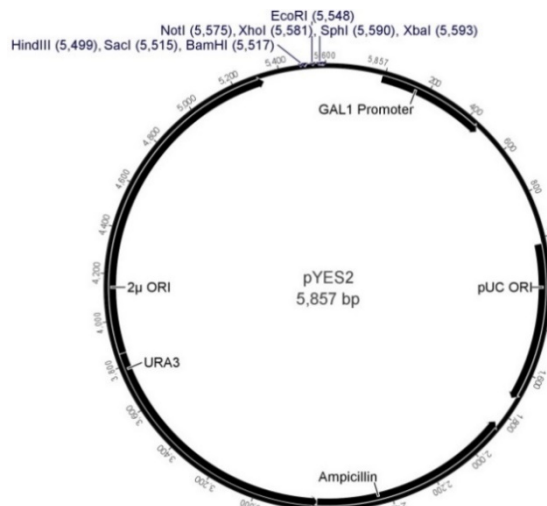
- pGEM®-T easy



- pQE70



- pYES2



1.7 Antibiotika

Um rekombinante *E. coli* Stämme, einschließlich der Plasmide, welche das GOI tragen, zu selektieren und zu vermehren, wurde jedes Medium mit dem jeweiligen Antibiotika in der Endkonzentration hergestellt, gegen welches das Plasmid das Resistenzgen besaß. Die verwendeten Antibiotika und deren Konzentrationen sind in Tabelle 9 ersichtlich.

Tabelle 9 Antibiotika und deren Konzentrationen

Antibiotikum	Stammlösung	Löslichkeit	Endkonzentration
Ampicillin (Roth)	100 mg/ml	bidest. Wasser	100 µg/ml
Kanamycin (Roth)	25 mg/ml	bidest. Wasser	25 µg/ml
Chloramphenicol (Roth)	34 mg/ml	Ethanol	34 µg/ml

1.8 Primer für Klonierung und Sequenzierung

Die aufgeführten Oligonukleotidprimer wurden von den Firmen Microsynth AG (Balgach, Schweiz) und Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Oligonukleotidprimer sind basierend auf deren Anwendung in den folgenden Tabellen aufgeführt (Tabelle 10, Tabelle 11 und Tabelle 12).

1.8.1 Oligonukleotidprimer für Sequenzierungen

Tabelle 10 Primer für Sequenzierung

Primername	Sequenz (5' → 3')
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT
Gal4 AD	TACCACTACAATGGATG
Gal4 BD	TCATCGGAAGAGAGTAG
SP6	CATTTAGGTGACACTATAG
pGWR8_TLfwseq (spezifischer Primer)	CGAATCTCAAGCAATCAAGC
pGWR8_T3rvseq (spezifischer Primer)	AATTAACCCTCACTAAAGGG
pQE for	GTATCACGAGGCCCTTTCGTCT
pQE rev	CATTACTGGATCTATCAACAGGAG

1.8.2 Primer für die Synthese von cDNA: Oligo(dT)₁₅ Primer

Oligo(dT)₁₅ Primer (500 µg/ml; 5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-3'; Promega, Madison, WI, USA) wurden für die Erst-Strang-cDNA-Synthese mit Hilfe der M-MLV reversen Transkriptase eingesetzt.

1.8.3 Oligonukleotidprimer

In Tabelle 11 finden sich die Oligonukleotidprimer für die Klonierung von cDNA, die Entwicklung von Protein-Expressionsvektoren und die Hefe Zwei-Hybrid Experimente. Unterstrichene Sequenzpositionen zeigen die gentechnisch eingefügten und verwendeten Restriktionsschnittstellen an. Die Schmelztemperatur T_m war immer jeweils abhängig von den PCR Optimierungen zwischen 50 und 60 °C.

Primerdesign für Fra a 1.01E-1.08 und FaAP: Das Design der Primer für die entsprechenden ORF-Sequenzen der acht Fra a 1 Isoformen für den Vektor pQE70 wurde unter Verwendung der Genomsequenz von *F. vesca* und früher bekannter und veröffentlichter Sequenzinformationen durchgeführt (VII.1). Das Primerdesign für die Isoformen Fra a 1.04-1.08 wurde von Frau Dr. Fatma Besbes (BiNa, WZW, TUM) durchgeführt. Die Primer für Fra a 1.01E, Fra a 1.03, Fra a 1.04 und Fra a 1.06-1.08 enthalten die Restriktionsendonukleasestellen *SphI* und *BamHI*. Für Fra a 1.02 und Fra a 1.05 wurden die Restriktionsendonukleasen *SphI/SphI* bzw. *SphI/BglIII* eingesetzt (II.1.9).

Mit der MdAP Sequenz und dem Genom von *F. vesca* wurde ein Sequenzalignment durchgeführt, um die Sequenz von FaAP zu identifizieren (VII.1.5, VII.1.6). Die cDNA von FaAP wurde N-terminal mit der cDNA von *eGFP* (enhanced Green Fluorescent Protein; VII.1.7), getrennt durch eine Schnittstelle der Thrombinprotease, fusioniert. Das cDNA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *EcoRI* in den Vektor pET28b, welcher sowohl N- als auch C-terminal His-tags aufweist, im Leseraster eingefügt. *eGFP* wurde als Negativkontrolle ebenfalls in den Vektor pET28b mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *Ecl136II* kloniert.

Primerdesign für Hefe Zwei-Hybrid Analysen: Für das Design der Primer für die entsprechenden ORF-Sequenzen der drei Fra a 1 Isoformen und FaAP wurden die Genomsequenz von *F. vesca* (Shulaev, Sargent et al. 2011), die Sequenzen von Fra a 1.01E-1.03 und FaAP, welche bereits in den Vektor pQE70 bzw. pET28b kloniert vorlagen (VII.1) und die MdAP sowie Mal d 1 Sequenz benötigt (Puehringer, Zinoecker et al. 2003). Die Gene *Fra a 1.01E*, *Fra a 1.02* und *Fra a 1.03* wurden in den Vektor pGADT7 mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI* und in den Vektor pGBKT7 mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *PstI* eingefügt.

Auch die cDNA von FaAP wurde in die Vektoren pGADT7 und pGBKT7 mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *SacI* bzw. *NcoI* und *SallI* kloniert. Des Weiteren wurde FaAP in ca. zwei gleich große Teile geteilt und in die Vektoren pGADT7 und pGBKT7 eingefügt. Der N-terminale Teil erstreckte sich von 1-291 bp (FaAP-N). Die Restriktionsendonucleasen *BamHI* und *XhoI* wurden für den Vektor pGADT7 und die Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *EcoRI* wurden für die Klonierung in den Vektor pGBKT7 eingesetzt. Der C-terminale Teil von FaAP (FaAP-C) erstreckte sich von 292 bp bis 582 bp, die Restriktionsendonucleasen *BamHI* und *SacI* wurden für den Vektor pGADT7 und die

Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *Sall* wurden für die Klonierung in den Vektor pGBKT7 eingesetzt. Auch die cDNA von *Mal d 1* und *MdAP*, isoliert aus *M. domestica* cv. Golden Delicious (VII.1.4, VII.1.6), wurden in den Vektor pGADT7 mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI* bzw. *BamHI* und *SacI* kloniert. Für den Vektor pGBKT7 wurden die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *PstI* bzw. *NcoI* und *Sall* eingesetzt (II.1.9).

Tabelle 11 Oligonukleotidprimer für verschiedene Experimente

Primername	Experiment und Vektor	Sequenz (5' → 3')
Fraa1_SphI_fw	Expression; pQE70	GATCGCATGCTGATGGGTGTTTACTTATGAAAACGAG
Fraa1_BamHI_rv	Expression; pQE70	GATCGGATCCGTTGTATTGCTGGGGTGGTCCTTGAG
Fraa2_SphI_fw	Expression; pQE70	GATCGCATGCTGATGGGTGTTTCACTTATGAAACCGAG
Fraa2_SphI_rv	Expression; pQE70	GATCGCATGCAACAGTATTCATTAGGATTGGCCAAGAG
Fraa3_SphI_fw	Expression; pQE70	GATCGCATGCTGATGGGTGTGTTACATACGAATCCGAG
Fraa3_BamHI_rv	Expression; pQE70	GATCGGATCCGTTGTATTCCTCAGGATGGGCCAAGAG
GFP_fw_BamHI	Expression; pET28b(+)	CGCGGATCCATGGTGAGCAAGGGC
GFP_rv_Thrombin1	Expression; pET28b(+)	CGCGGATACATCTTGTACAGCTCGTCCAT
FaAP_fw_Thrombin2	Expression; pET28b(+)	CCGCGCGGCAACATGGGTTGGGTGTGGAAG
FaAP_rv_EcoRI	Expression; pET28b(+)	CTCGAATTCAACATCTCTTGCCAACCCAGA
GFP_rv_GFP_Ecl136II	Expression; pET28b(+)	GATCGAGCTCCCTTGTACAGCTC
Fraa1_AD_fw_NdeI	Y2H; pGADT7	TACGCATATGATGGGTGTTTACTTATGAAAAC
Fraa1_AD_rv_XhoI	Y2H; pGADT7	GCAGCTCGAGTTAGTTGTATTGCTGGGGTG
Fraa2_AD_fw_NdeI	Y2H; pGADT7	TACGCATATGGGTGTGTTCACTTATGAAACC
Fraa2_AD_rv_XhoI	Y2H; pGADT7	GCAGCTCGAGTTAACAGTATTCATTAGGATT
Fraa3_AD_fw_NdeI	Y2H; pGADT7	TACGCATATGGGTGTGTTACATACGAATCC
Fraa3_AD_rv_XhoI	Y2H; pGADT7	GCAGCTCGAGTTAGTTGTATTCCTCAGGATG
FaAP_AD_fw_BamHI	Y2H; pGADT7	GGGCGGATCCGGTTGGGTGTGGAAGGACGAC
FaAP_AD_rv_SacI	Y2H; pGADT7	GCTCGAGCTCTCAAACATCTCTTGCCAACCC
FaAP_AD_rv_1.T_XhoI	Y2H; pGADT7	CTGCCTCGAGTGACCCAAAGGACACAGACCC
FaAP_AD_fw_2.T_BamHI	Y2H; pGADT7	GATCGGATCCACATGGCAGACAATGGAGCATTTAAC
Mald1_AD_fw_NdeI	Y2H; pGADT7	CGCTCATATGGGTGTCTACACATTTGAGAACG
Mald1_AD_rv_XhoI	Y2H; pGADT7	GCAGCTCGAGTTAGTTGTATGCGTCGGGGTGG
MdAP_AD_fw_BamHI	Y2H; pGADT7	GGGCGGATCCGGTGGGTGTGGAGGGACGAC
MdAP_AD_rv_SacI	Y2H; pGADT7	GCTCGAGCTCTGATGACCCAAAGGTGGCAGA
Fraa1_BD_fw_EcoRI	Y2H; pGBKT7	GGCCGAATTCGGTGTGTTTACTTATGAAAAC
Fraa1_BD_rv_PstI	Y2H; pGBKT7	GCCGCTGCAGTTAGTTGTATTGCTGGGGTG
Fraa2_BD_fw_EcoRI	Y2H; pGBKT7	GGCCGAATTCGGTGTGTTCACTTATGAAACC
Fraa2_BD_rv_PstI	Y2H; pGBKT7	GCCGCTGCAGTTAACAGTATTCATTAGGATT
Fraa3_BD_fw_EcoRI	Y2H; pGBKT7	GGCCGAATTCGGTGTGTTACATACGAATCC
Fraa3_BD_rv_PstI	Y2H; pGBKT7	GCCGCTGCAGTTAGTTGTATTCCTCAGGATG
FaAP_BD_fw_NcoI	Y2H; pGBKT7	ATGGCCATGGGAGGTTGGGTGTGGAAGGACG

FaAP_BD_rv_Sall	Y2H; pGBKT7	GCAGGTCGACTCAAACATCTCTTGCCAACCC
FaAP_BD_rv_1.T_EcoRI	Y2H; pGBKT7	CTGCGAATTCTGACCCAAAGGACACAGACCC
FaAP_BD_fw_2.T_BamHI	Y2H; pGBKT7	GATCGGATCCATGGCAGACAATGGAGCATTTAAC
Mald1_BD_fw_EcoRI	Y2H; pGBKT7	GGCCGAATTCGGTGTCTACACATTTGAGAACG
Mald1_BD_rv_PstI	Y2H; pGBKT7	GCCGCTGCAGTTAGTTGTATGCGTCGGGGTGG
MdAP_BD_fw_NcoI	Y2H; pGBKT7	ATGGCCATGGGAGGGTGGGTGTGGAGGGACG
MdAP_BD_rv_Sall	Y2H; pGBKT7	GCAGGTCGACTCAAACCTCTCTTGCCAAGCC

1.8.4 Oligonukleotidprimer für die relative Genexpressionsanalyse

Tabelle 12 Oligonukleotidprimer für relative Genexpressionsanalyse

Primername	Sequenz (5' → 3')
Fra a 1e fw	TCCTTATCCCTGCTTGCTT
Fra a 1e rv	AGGTGATCTTCTTGATGGTTCC
Fra a 2 fw	CGTGGAGATCAAGGAAGAGC
Fra a 2 rv	GGAACATCAGCGGAACAAAT
Fra a 3 fw	GTTAAGGCCGAAAGGAAAG
Fra a 3 rv	GATCGAGCAGATTGACACCA
FaAP_qRT-PCR_fw	CATCTTCTTGTGCCCCAAGTACTTA
FaAP_qRT-PCR_rv	CGGTGCGCCGTCCAATCTGGGGCTGA
Interspacer (Haushaltsgen; FaRIB413) Primer (16S-23S Interspacer (IS) Region):	
IS-RT fw	ACCGTTGATTCGCACAATTGGTCATCG
IS-RT rv	TACTGCGGGTCCGCAATCGGACG

1.9 Enzyme und weitere verwendete Substanzen

Tabelle 13 Informationen zu Enzymen und weiteren verwendeten Substanzen

Enzym	Enzymname	Lieferant
DNA Polymerase und entsprechende Puffer	<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
	10 × ThermoPol Reaktionspuffer (mit MgCl ₂)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
	<i>Phusion</i> [®] high-fidelity DNA Polymerase (2 U/μl)	Thermo Scientific Finnzymes, Schwerte, Deutschland
	<i>Phusion</i> DNA Polymerase (pET30 <i>Phusion</i> DNA Polymerase, His-tag)	Expression und Aufreinigung im BiNa Labor, Freising, Deutschland
	5 × <i>Phusion</i> GC oder HF Puffer	Thermo Scientific Finnzymes, Schwerte, Deutschland
Reverse Transkriptase	M-MLV RT (200 U/μl)	Promega, Madison, WI, USA
	M-MLV RT 5 × Puffer	Promega, Madison, WI, USA
Restriktionsenzyme (Fast Digest (FD))	<i>SphI</i> , <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>Ecl136II</i> , <i>NdeI</i> , <i>XhoI</i> , <i>SacI</i> , <i>PstI</i> , <i>NcoI</i> , <i>Sall</i>	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
	10 × Fast Digest (FD) Puffer	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
		Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Weitere Enzyme	DNase I (RNase-free; 1 U/μl)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot, Deutschland
	DNase Puffer mit MgCl ₂	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
	RNase A (10 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
	T4 DNA Ligase (5 U/μl)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
	RNasin [®] Plus RNase Inhibitor (40 U/μl)	Promega, Madison, WI, USA

	Lysozym vom Huhn	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Weitere verwendete Substanzen	<i>Betula pendula</i> (Birke) Pollen	BONAPOL, Kaplice, Tschechische Republik
	dATP (100 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
	dNTPs (10 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
	rBet v 1a (<i>Betula verrucosa 1a</i>) für Skin-Prick-Test	Biomay, Wien, Österreich
	Erdbeerextrakt für Skin-Prick-Test	ALK-Abelló Arzneimittel GmbH, Hamburg, Deutschland

1.10 Medien, Puffer und Lösungen

Die unten genannten Medien, Puffer und Lösungen wurden wie beschrieben hergestellt. Zur Herstellung von Selektionsplatten wurde 1,5% Agar zugegeben. Nach dem Autoklavivorgang und dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden die jeweiligen Antibiotika (Tabelle 9) oder Chemikalien (Tabelle 6) zugegeben.

1.10.1 Medien

LB Medium/Platten (Bertani 1951)	10 g/L 5 g/L 10 g/L 15 g/L	Trypton Hefeextrakt NaCl Agar (für Platten)
	Der pH wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt, mit bidest Wasser aufgefüllt und autoklaviert.	
SOC Medium	2% (w/V) 0,5% (w/V) 10 mM 2,5 mM 10 mM 10 mM 20 mM	Trypton Hefeextrakt NaCl KCl MgCl ₂ • 6H ₂ O MgSO ₄ Glukose (<i>frisch hergestellt und zugesetzt</i>)
	Der pH wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt, mit bidest Wasser aufgefüllt, in 50 ml Gefäße aliquotiert und bei -20°C gelagert.	
YPD-Medium	1% (w/V) 2% (w/V) 2% (V/V)	Hefeextrakt Pepton D-Glukose (<i>frisch zugesetzt</i>)
	Nach dem Autoklavivorgang und dem Abkühlen auf 50°C wurde die Kohlenstoffquelle D-Glukose frisch hinzugefügt.	
SC-L Medium (synthetisches Minimalmedium für Hefe; (Abelson, Simon et al. 2004)	0,67% (w/V) 2% (V/V)	Hefe-Stickstoff-Basismedium (ohne Aminosäuren) Kohlenstoffquelle (D-Glukose Stammlösung oder D-Galaktose Stammlösung; <i>frisch zugesetzt</i>)
	Aminosäuren:	
	0,01% (w/V)	Adenin, Arginin, Cystein, Lysin, Threonin, Tryptophan, Uracil
	0,005% (w/V)	Asparaginsäure, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin
	2% (w/V)	Agar (für Platten)
	Nach dem Autoklavivorgang und dem Abkühlen auf 50°C wurde die Kohlenstoffquelle frisch hinzugefügt.	

SC-W Medium (synthetisches Minimalmedium für Hefe; (Abelson, Simon et al. 2004)	0,67% (w/V) 2% (V/V) Aminosäuren: 0,01% (w/V) 0,005% (w/V) 2% (w/V)	Hefe-Stickstoff-Basismedium (ohne Aminosäuren) Kohlenstoffquelle (D-Glukose Stammlösung oder D-Galaktose Stammlösung; <i>frisch zugesetzt</i>) Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin, Uracil Asparaginsäure, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin Agar (für Platten)
	Nach dem Autoklaviervorgang und dem Abkühlen auf 50°C wurde die Kohlenstoffquelle frisch hinzugefügt.	
SC-LWH Medium (synthetisches Minimalmedium für Hefe; (Abelson, Simon et al. 2004)	0,67% (w/V) 2% (V/V) Aminosäuren: 0,01% (w/V) 0,005% (w/V) 2% (w/V)	Hefe-Stickstoff-Basismedium (ohne Aminosäuren) Kohlenstoffquelle (D-Glukose Stammlösung oder D-Galaktose Stammlösung; <i>frisch zugesetzt</i>) Adenin, Arginin, Cystein, Lysin, Threonin, Uracil Asparaginsäure, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin Agar (für Platten)
	Nach dem Autoklaviervorgang und dem Abkühlen auf 50°C wurde die Kohlenstoffquelle frisch hinzugefügt. Für Hefe Zwei-Hybrid Experimente wurden zusätzlich unterschiedliche Konzentrationen (2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM) von steril filtrierten Amino-1, 2, 4-triazol (3-AT) nach dem Abkühlen auf 50°C hinzugefügt.	
1.10.2 Puffer		
10 × DNA Ladepuffer	0,21% (w/V) 0,1 M 50% (V/V)	Orange G EDTA (pH 8,0) Glyzerin
	Der pH wurde auf 8,0 eingestellt und der Puffer wurde mit DNase- und RNase-freiem Wasser aufgefüllt.	
50 × TAE Puffer (Mulhardt 2010)	242 g/L 100 ml/L 57,1 ml/L	TRIS-HCl (pH 8,0) EDTA (0,5 M; pH 8,0) Essigsäure
	Der pH wurde auf 8,0 eingestellt und der Puffer wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.	
Triturationspuffer für die Herstellung chemo-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen (NEB 10ß; BL21(DE3) pLysS)	100 mM 90 mM 40 mM	CaCl ₂ • 2H ₂ O MgCl ₂ • 6H ₂ O NaOAc
	Der pH wurde auf 5,5 eingestellt, mit bidest. Wasser aufgefüllt und durch einen 0,45 µm Filter steril filtriert.	
TE Puffer	1 mM 10 mM	EDTA (pH 8,0) TRIS-HCl (pH 8,0)
	Der pH wurde auf 8,0 eingestellt und der Puffer wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.	
10 × PBS Puffer	80 g/L 2 g/L 14,4 g/L 2,4 g/L	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
	Der pH wurde auf 7,4 eingestellt, der Puffer mit bidest. Wasser aufgefüllt und autoklaviert	
CTAB RNA-Extraktionspuffer (Liao, Chen et al. 2004)	3% (w/V) 3% (w/V)	CTAB PVP, K30 (Roth)

	25 mM	EDTA (pH 8,0)	
	2 M	NaCl	
	0,1 M	TRIS-HCl (pH 8,0)	
		Der pH wurde auf 8,0 eingestellt und der Puffer wurde mit autoklaviertem DEPC-Wasser aufgefüllt.	
		Der RNA Extraktionspuffer wurde vor der Nutzung auf 65°C in einem Wasserbad erwärmt und 40 µl/ml β-Mercaptoethanol wurden frisch hinzugefügt.	
0,1 M NaPi (pH 7,5)	80,95 mM	Na ₂ HPO ₄	
	19,05 mM	NaH ₂ PO ₄	
His-tag Wasch-/Bindepuffer	20 mM	NaPi (pH 7.5)	
	0,5 M	NaCl	
	25 mM	Imidazole	
		Der pH wurde auf 7,5 eingestellt und der Puffer wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.	
His-tag Elutionspuffer	20 mM	NaPi (pH 7.5)	
	0,5 M	NaCl	
	0,4 M	Imidazole	
		Der pH wurde auf 7,5 eingestellt und der Puffer wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.	
Protein-Extraktionspuffer für <i>Fragaria</i> Proteine	0,5 M	TRIS-HCl (pH 7,5)	
	50 mM	EDTA (pH 8,0)	
	0,1 M	KCl	
	1% (w/V)	PVP, K30 (Roth)	
	0,7 M	Saccharose	
		Der pH wurde auf 7,5 eingestellt und der Puffer wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.	
	1 mM	PMSF (<i>frisch zugesetzt</i>)	
	2% (V/V)	β-Mercaptoethanol (<i>frisch zugesetzt</i>)	
10 × SDS Laufpuffer (Laemmli 1970)	0,25 M	TRIS-HCl (pH 8,3)	
	1,92 M	Glyzin	
	1% (w/V)	SDS	
		Der pH wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt und der Puffer wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.	
Native-PAGE Laufpuffer	0,025 M	TRIS-HCl (pH 8,3)	
	0,192 M	Glyzin	
		Der pH wurde mit HCl auf 8,3 eingestellt, der Puffer wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt und bei 4°C gelagert.	
4 × native Laemmli Puffer	20% (V/V)	Glyzerin	
	0,1 M	TRIS-HCl (pH 7,0)	
	0,1% (w/V)	Bromphenolblau	
		Der pH wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt, der Puffer wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt und bei 4°C gelagert.	
Semi-Dry-Blotting Puffer	25 mM	TRIS (pH 8,8)	
	200 mM	Glycine	
	20% (V/V)	Methanol	
		Der Puffer wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.	
Washing Puffer	20 mM	TRIS (pH 8,8)	
	140 mM	NaCl	
	0,1% (V/V)	Tween 20	
		Der Puffer wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.	
Blocking Puffer	5% (w/V)	Milchpulver in Washing Puffer	

Detection Puffer	100 mM	TRIS (pH 9,5)	
	100 mM	NaCl	
	5 mM	MgCl ₂	
	Der pH wurde auf 9,5 eingestellt und der Puffer wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.		
T-Puffer	10 mM	TRIS (pH 7.3)	
	50 mM	NaCl	
	Der pH wurde mit HCl auf 7,3 eingestellt und der Puffer wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.		
Puffer b	50 mM	NaPi (pH 7,2)	
	1 M	NaCl	
	Der pH wurde auf 7,2 eingestellt, mit bidest. Wasser aufgefüllt und durch einen 0,45 µm Filter steril filtriert.		
Puffer c	50 mM	NaPi (pH 7,2)	
	150 mM	NaCl	
	Der pH wurde auf 7,2 eingestellt, mit bidest. Wasser aufgefüllt und durch einen 0,45 µm Filter steril filtriert.		
1.10.3 Lösungen			
Ethanol	20%: 200 ml/L	Ethanol	
	30%: 300 ml/L	Ethanol	
	70%: 700 ml/L	Ethanol	
TRIS Stammlösungen	1,5 M	TRIS	
	Die Lösungen wurde mit HCl auf die pH-Werte 7,0, 7,5, 8,0, 8,3, 8,8 und 9,5 eingestellt und mit bidest. Wasser aufgefüllt.		
DEPC-Wasser	0,5% (V/V)	Diethylpyrocarbonat	
	Die Lösung wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt, über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert.		
0,5% SDS	2,5 ml	10% Natriumdodecylsulfat	
	Die Lösung wurde auf 50 ml mit DEPC Wasser aufgefüllt.		
8 M LiCl	8 M	Lithiumchlorid	
	Die Lösung wurde mit DEPC Wasser hergestellt und anschließend autoklaviert.		
Cl	24:1 (V/V)	Chloroform/Isoamylalkohol	
	Die Lösung wurde mit DEPC Wasser gesättigt.		
NaOAc-Lösung	3 M	Natriumacetat (pH 5,2)	
1% Agarosegel	1% (w/V)	Agarose in 1 × TAE Puffer	
	0.0005% (V/V)	Ethidiumbromid/Roti®-Safe GelStain	
D-Glukose Stammlösung für Hefemedien	20% (w/V)	D-Glukose in bidest. Wasser; Sterilfiltration durch 0,22 µm Filter	
Glyzerin Stammlösung (Mulhardt 2010)	65 ml/L	Glyzerin	
	1,2 g/L	MgSO ₄	
	0,3 g/L	TRIS-HCl (pH 8,0)	
	Der pH wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt, die Lösung wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt und anschließend autoklaviert.		
IPTG Stammlösung	23,8% (w/V)	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid in bidest. Wasser	
NiCl ₂ Lösung	0,2 M	NiCl ₂	
	Der pH wurde auf 7,0 eingestellt, die Lösung wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.		
His-tag Resin	50 mM	NaOAc	
Regenerationslösung	0,3 M	NaCl	
	Der pH wurde auf 4,0 eingestellt, die Lösung wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.		

PMSF Stammlösung	100 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid Die Lösung wurde mit Methanol hergestellt und bei -20°C gelagert.
Bradford Lösung (Bradford 1976)	10,01% (w/V) 5% (V/V) 10% (V/V)	Coomassie Brilliant Blue G250 Ethanol H ₃ PO ₄ Die Lösung wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.
10% SDS Stammlösung	10% (w/V)	SDS in bidest. Wasser
10% APS Stammlösung	10% (w/V)	Ammoniumpersulfat in bidest. Wasser
SDS-PAGE		<u>12% Trenngel (1 Gel)</u> 2,45 ml bidest. Wasser 3 ml 30% (V/V) Acrylamid 1,9 ml 1.5 M TRIS-HCl (pH 8,8) 0,075 ml 10% (w/V) SDS 0,075 ml 10% (w/V) APS 0,003 ml TEMED <u>7% Sammelgel (1 Gel)</u> 1,85 ml bidest. Wasser 0,7 ml 30% (V/V) Acrylamid 0,375 ml 1.5 M TRIS-HCl (pH 8,8) 0,030 ml 10% (w/V) SDS 0,030 ml 10% (w/V) APS 0,003 ml TEMED
Native-PAGE		<u>10% Trenngel (1 gel)</u> 3,025 ml bidest. Wasser 2.5 ml 30% (V/V) Acrylamid 1.9 ml 1.5 M TRIS-HCl (pH 8.8) 0.075 ml 10% (w/V) APS 0.003 ml TEMED <u>7% Sammelgel (1 Gel)</u> 1,88 ml bidest. Wasser 0,7 ml 30% (V/V) Acrylamid 0,375 ml 1.5 M TRIS-HCl (pH 8,8) 0,030 ml 10% (w/V) APS 0,003 ml TEMED
Coomassie Färbelösung	0,33 g 120 ml 24 ml 120 ml	Coomassie Brilliant Blue G250 Methanol Essigsäure bidest. Wasser
Coomassie Entfärbelösung	200 ml/L 100 ml/L	Ethanol Essigsäure Die Lösung wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.
Fixierlösung (Silberfärbung)	40% 10%	Ethanol Essigsäure Die Lösung wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.
Waschlösung (Silberfärbung)	30%	Ethanol Die Lösung wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.
Thiosulfatlösung (Silberfärbung)	0,2 g/L	Natriumthiosulfat Die Lösung wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.
Silbernitratlösung (Silberfärbung)	2 g/L 750 µl/L	Silbernitrat Formaldehyd Lösung (37%) Die Lösung wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.

Entwicklungslösung (Silberfärbung)	30 g/L 500 µl/L 4 mg/L Die Lösung wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt	Natriumcarbonat Formaldehyd Lösung (37%) Natriumthiosulfat
Konservierungslösung (Silberfärbung)	25% 3% Die Lösung wurde mit bidest. Wasser aufgefüllt.	Ethanol Glyzerin
BCIP Lösung (Dinatriumsalz)	5% (w/V)	BCIP in bidest. Wasser
NBT	5% (w/V)	NBT in 70% DMF
Ammoniumacetate	8 mM Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.	in Methanol gesättigtes Ammoniumacetat

1.11 Kommerzielle Kits

Tabelle 14 Informationen über kommerzielle Kits

Kommerzielle Kits	Verwendung	Lieferant
Amine Coupling Kit 1 (MW >1 kDa)	Funktionalisierung von Nanolevers über Amine (-NH ₂) – <i>in vitro</i>	Dynamic Biosensors GmbH, Martinsried/Planegg, Deutschland
FlowCAST® Basophil Activation Test (BAT) Flow Cytometry IMMULITE 2000DPC Immunoassay System	Analyse des allergenen Potentials mittels FACScan Analyse von spezifischen Serum IgE in Vollblut	Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz Siemens Healthcare Global, Erlangen, Deutschland
MATCHMAKER Two-Hybrid System 3	Yeast Two-Hybrid Analyse	Clontech, Saint-Germain-en- Laye, Frankreich
NucleoSpin® Gel und PCR Clean-up	Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Agarosegel	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
pGEM®-T Easy Vector System I	Klonierungs-Zwischenschritt in einen Shuttlevektor	Promega, Madison, WI, USA
PureYield™ Plasmid Miniprep System	Aufreinigung von Plasmid-DNA	Promega, Madison, WI, USA
QIAquick® Gel Extraction Kit	Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Agarosegel	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
S. c. EasyComp.™ Transformation	Herstellung und Transformation von chemo- kompetenten <i>S. cerevisiae</i> Zellen	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
SensiMix™ SYBR Hi-Rox	Durchführung einer qRT-PCR für Expressionsstudien	Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland

1.12 DNA und Proteinmarker

Zum Bestimmen der ungefähren Molekulargewichte der aufgetrennten DNA-Fragmente auf einem Agarosegel wurde der GeneRuler™ DNA Ladder Mix (6µl/100ml Agarosegel; Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) eingesetzt. Als Marker für die Auftrennung von Proteinen auf einer SDS-PAGE wurde der PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (8µl/SDS-PAGE; Thermo Scientific, Rockford, USA) und als Marker für die Auftrennung von nativen Proteinen auf einer Nativen PAGE wurde der Native Marker Liquid Mix for BN/CN (8µl/Nativer PAGE; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet (Abbildung 16).

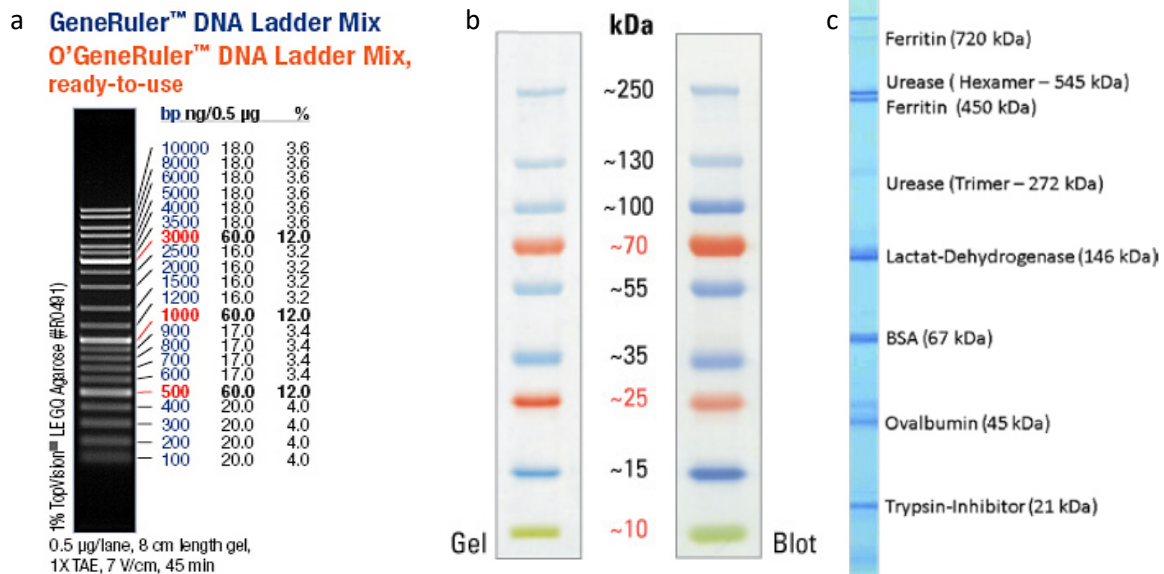


Abbildung 16 Auftrennungsmuster der verwendeten DNA- und Protein Marker. a: GeneRuler™ DNA Ladder Mix; b: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder; c: Native Marker Liquid Mix for BN/CN.

1.13 Antikörper

Tabelle 15 Primäre und sekundäre Antikörper

Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
Anti-GST (monoklonal), Verdünnung: 1:10000, hergestellt in Maus (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)	Anti-Mouse AP Konjugat (monoklonal), Verdünnung: 1:30000 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Anti-6x His AP Konjugat (monoklonal), Verdünnung: 1:4000 (Abcam, Cambridge, Großbritannien)	/
Anti-Fra a 1.02 (polyklonal), Verdünnung: 1:134000, hergestellt in Kaninchen (Coring System Diagnostix GmbH, Gernsheim am Rhein, in Kooperation mit CovalAb S.A.S., Villeurbanne, Frankreich)	Anti-rabbit IgG (Fc) AP Konjugat (monoklonal), Verdünnung: 1:4000 (Promega Madison, WI, USA)

2. Software und Internet-Ressourcen

- ACD/ChemSketch Version 12.0 (Advanced Chemistry Development, Toronto, Kanada)
- Agarosegel Elektrophorese bio imaging System G: BoX (Syngene, Cambridge, Großbritannien)
- BD CellQuest™ (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
- Das R Projekt für statistische Berechnungen, The R Foundation for Statistical Computing Version 2.13.0 (Ihaka and Gentleman 1996, Team 2014); <http://www.r-project.org/>)
- FACStation™ Software, Auswertefunktionen: Flow2Cast „Zählung“ und Flow2Cast „Auswertung Einfach“ (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
- Geneious™ Pro 5.5.3 (Drummond, Ashton et al.; Biomatters, Auckland, Neuseeland)
- GeneSnap Version 6.07.04 (SynGene, Cambridge, Großbritannien)
- ImageJ Version 1.48 (Schneider, Rasband et al. 2012)
- Mascot Distiller v2.4.3.1 (Matrix Science, Großbritannien)
- Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Remond, USA)
- Microsoft Office Picture Manager 2010 (Microsoft Corporation, Remond, USA)
- Microsoft Word 2010 (Microsoft Corporation, Remond, USA)
- NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- PyMOL 1.2r1 (Delano scientific Ltd.)

- Reverse Complement (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)
- StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Software Version 2.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)
- Scaffold™ Version 4.3.2 (Searle 2010)
- senseMAKER beta Version 1.1.0.3 (Dynamic Biosensors GmbH, Martinsried/Planegg, Deutschland)
- switchANALYSIS Version 1.1.1.0 (Dynamic Biosensors GmbH, Martinsried/Planegg, Deutschland)
- Genom Zusammenstellung, Annotation und Informationen über das *Fragaria vesca* Genom (Shulaev, Sargent et al. 2011, Tennessen, Govindarajulu et al. 2014; https://www.rosaceae.org/species/fragaria_vesca/genome_v2.0.a1)
- UNICORN™ start Version 1.0.Ink (GE Healthcare, Biosciences AB, Uppsala, Schweden)

3. Geräte und Verbrauchsmateriel

3.1 Geräte

Gerät	Verwendung	Lieferant
Autoclave Pro-face	Autoklav	Fedegari, Fernwald, Deutschland
BD FACScan™	Basophilen Aktivierungstest	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
DRX 2400	Messung der Proteininteraktion	Dynamic Biosensors GmbH, Martinsried/Planegg, Deutschland
LTQ Orbitrap XL	MS für die Sequenzierung von Peptiden	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
nanoLC Ultra 1D LC System	HPLC für die Sequenzierung von Peptiden	Eksigent, Kanada
Eismaschine Scotsman AF80		Hubbard Systems, Ipswich, Großbritannien
Elektrophorese Roth HU10 (Agarosegel)		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Elektrophorese Kammer (PAGE)		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
hp Scanjet 3570c		Palo Alto, Kalifornien, USA
Inkubator Thermo Forma™		Thermo Scientific, München, Deutschland
Steri-Cycle™ CO2, HEPA Filter		SEG, Rehlingen-Siersburg, Deutschland
Kühlschrank (4 °C)		
Magnetrührer-Heizplatte MR3001		Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Membranpumpe CVC 2000		Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Mikrowelle		Sharp Electronics GmbH, Hamburg, Deutschland
Mini Semidry Blotter		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NanoDrop ND-1000		peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

Orbital Schüttler neoLab DOS-10L	neoLab, Heidelberg, Deutschland
PCR-Maschine Labcycler	SensoQuest, Göttingen, Deutschland
pH-Meter CG 820	Schott Geräte, Mainz, Deutschland
Schüttelinkubator	GFL, Burgwedel, Deutschland
Spektrophotometer Nicolet evolution 100	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Kalifornien, USA
Sterilbank HERA Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Consort E 132, EV 245, E 835	Consort, Turnhout, Belgien
Bio-Rad PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Thermomixer komfort 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tiefkühltruhe -20 °C	Quelle, Fürth, Deutschland
Tiefkühltruhe -80 °C	Skadi Europe, Wrede, Niederlande
Ultraschallbad RK103H	Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
Ultraschallhomogenisator Bandelin Sonopuls UW2200	Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
Scaltec SPB61	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Sartorius X634	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Scout Pro	OHAUS Corporation, Parsippany, NY, USA
Vortexer VV3	VWR, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	Julabo, Seelbach, Deutschland
Wärmethermostat mit Edelstahlbad LAUDA Eco Silver	Lauda, Königshofen, Deutschland
Sigma 4K15C	Sigma, Osterode, Deutschland
Sigma 1-14	Sigma, Osterode, Deutschland
Eppendorf 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.2 Verbrauchsmaterial

Material	Lieferant
Filterpapier (570×460 mm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Linde AG, München, Deutschland
MicroAmp™ optischer Klebefilm	Applied Biosystems, CA, USA
MicroAmp® Schnelle 96-Well-Reaktionsplatte (0,1 ml)	Applied Biosystems, CA, USA
Roti®-PVDF Membran	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotilab® Spritzenfilter PVDF steril (0,22 µm; 0,45 µm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Vorsäule: ReproSil-Pur C18 20 mm x 75 µm	Dr. Maisch, Freising, Deutschland

Trennsäule: ReproSil-Pur C18 400 mm x 50 µm	Dr. Maisch, Freising, Deutschland
Thiolierte 48-x Oligonukleotide	Metabion, Planegg, Deutschland
Triaminierte DNA	IDT, Leuven, Belgien
Profinity™ IMAC Ni-geladenes Resin	Bio-Rad, München, Deutschland
Vermehrungssubstrat SP ED63 P mit Exemptor 0,4 g/l	Bereitgestellt durch GH L Dürnast Bayer CropScience GmbH, Langenfeld, Deutschland
Zeba™ Entsalzungssäulen	Thermo Scientific, Rockford, USA

4. Methoden

4.1 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden wurden unter dem Punkt II.4.1 gemeinsam aufgeführt, um die Reihenfolge der Methoden zu verdeutlichen.

4.1.1 Extraktion von Gesamt-RNA

Zu Beginn der Extraktion von Gesamt-RNA wurden alle Geräte und Flächen sorgfältig mit 70% (V/V) Ethanol von RNasen gereinigt. Alle Puffer und Lösungen wurden mit DEPC-Wasser (II.1.10.3) angesetzt. Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders beschrieben, in Eis oder Stickstoff gekühlten Behältnissen durchgeführt.

Die Gesamt-RNA wurde wie von Liao und Kollegen beschrieben aus den Früchten von *F. xananassa* cv. Elsanta, *F. xananassa* cv. Mara des Bois, *F. vesca* rot-fruchtiger Wildtyp (WT; unbeschriebene Sorte), *F. vesca* cv. Yellow Wonder (Tabelle 1) und *Malus domestica* Borkh. (Sorte Golden Delicious Typus Auvil Spur) extrahiert (Liao, Chen et al. 2004). Zwei g bei -80°C gefrorenes Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff unter Verwendung eines sterilen Mörsers und Pistills zu einem feinen und homogenen Pulver gemahlen. 20 ml von 65°C vorgewärmten RNA-Extraktionspuffer (II.1.10.2) wurden vorsichtig mit dem Pflanzenmaterial in einem 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß gemischt, für 10 min in einem vorgewärmten 65°C warmen Wasserbad inkubiert und währenddessen dreimal erneut vorsichtig manuell gemischt. Das gleiche Volumen an CI (II.1.10.3) wurde zugegeben und das 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß 10 min vorsichtig manuell invertiert. Nach dem Zentrifugationsschritt (10 min, 12.000 rpm, 10°C) wurde der Überstand in ein neues 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Der CI-Extraktionsschritt wurde noch einmal wiederholt. Um die Gesamt-RNA auszufällen, wurden die gesammelten Überstände von zwei CI-Extraktionen mit 1/3 des Gesamtvolumens von 8 M LiCl (II.1.10.3) in ein neues 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt, sehr gut gemischt und bei 4°C über Nacht gelagert. Die RNA wurde mittels Zentrifugation (30 min, 12.000 rpm, 4°C) pelletiert. Nachdem der Überstand dekantiert worden war, wurde die pelletierte RNA in 500 µl 0,5% SDS (II.1.10.3) rückgelöst und in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Lösung wurde durch Vortexen für 30 sec mit dem gleichen Volumen an CI gemischt. Anschließend wurde ein Zentrifugationsschritt (10 min, 12.000 rpm, 10°C) durchgeführt, der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und der CI-Extraktionsschritt noch einmal wiederholt. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit dem zweifachen Volumen von 100% Ethanol (-20°C) gemischt und 2 h bei -20°C gelagert, um die RNA auszufällen. Mittels Zentrifugation (30 min, 13.200 rpm, 4°C) wurde die RNA pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das RNA-Pellet wurde dreimal mit 70% Ethanol (-20°C) und einmal mit 100% Ethanol (-20°C) gewaschen, jeweils gefolgt von einem Zentrifugationsschritt (5 min, 13.200 rpm, 4°C). Der Überstand wurde sorgfältig dekantiert und das Pellet trocknete an der Luft unter der Sterilbank. Die isolierte Gesamt-RNA wurde in 20-50 µl DEPC-Wasser gelöst. Gesamt-RNA wurde bezüglich deren Reinheit und des Grades des RNA Abbaus mittels NanoDrop (II.3.1) untersucht. Die ermittelten Verhältnisse zwischen $A_{260}:A_{280}$ und $A_{260}:A_{230}$ müssen ca. bei einem Wert von zwei liegen. Zusätzlich wurde die Gesamt-RNA auch einer Agarosegelelektrophorese (II.4.1.5) unterzogen. Proben von Gesamt-RNA müssen zwei klare und intakte Banden für 28S-rRNA und 18S-rRNA (4,7 nt bzw. 1,8 nt)

mit geringer Verschmierung aufweisen. Dies weist auf einen geringen oder keinen RNA-Abbau hin. Die Gesamt-RNA wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.1.2 Entfernung von kopräzipitierter genomischer DNA

Um die extrahierte Gesamt-RNA von kopräzipitierter pflanzlicher genomischer DNA zu reinigen, wurden 5 µg RNA (max. 15 µl) mit 3 µl DNase-Puffer mit MgCl₂, 3 µl DNase I (2U DNase I laut Herstellerangaben; II.1.9) und 9 µl DEPC-Wasser in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. Dieser 30 µl-Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl DEPC-Wasser und 150 µl Phenol/Chloroform (1:1, V/V) hinzugegeben, vorsichtig gemischt und zentrifugiert (5 min, 12.000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 150 µl CI ausgeschüttelt und erneut zentrifugiert (5 min, 12.000 rpm, 4°C). Die beiden organischen Phasen wurden vereinigt und erneut mit 100 µl DEPC-Wasser ausgeschüttelt. Nach einer erneuten Zentrifugation (5 min, 12.000 rpm, 4°C) wurde der gesamte Überstand aus den Extraktionsverfahren vereinigt und die Gesamt-RNA mit drei Volumina 100% Ethanol und 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2, RNase-frei, in DEPC-Wasser; II.1.10.3) bei -80°C für 3 h präzipitiert. Die Gesamt-RNA wurde mittels Zentrifugation (30 min, 12.000 rpm, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, das RNA-Pellet zweimal mit 70% Ethanol (-20°C) und einmal mit 100% Ethanol (-20°C) gewaschen, jeweils gefolgt von Zentrifugationsschritten (5 min, 13.200 rpm, 4°C). Der Überstand wurde sorgfältig dekantiert und das Pellet trocknete an der Luft unter der Sterilbank. Die isolierte und gDNA-freie Gesamt-RNA wurde in 20 µl DEPC-Wasser gelöst und qualitativ und quantitativ unter Verwendung von NanoDrop analysiert. Die gDNA-freie Gesamt-RNA wurde bei -80°C gelagert.

4.1.3 Erst-Strang-cDNA Synthese (reverse Transkription)

Die intakte Gesamt-RNA wurde in komplementäre DNA umgeschrieben. Für die reverse Transkriptionsreaktion wurden alle RNA-Proben auf die gleiche RNA-Konzentration eingestellt.

Tabelle 16 Pipettierschema für die reverse Transkription

Komponenten	1-facher Ansatz
Teil 1	Maximales Volumen: 14 µl
max. 5 µg Gesamt-RNA	max. 12 µl
oligo(dT) ₁₅ (II.1.8.2)	1 µl
dNTP (II.1.9) in DEPC-Wasser (II.1.10.3)	1 µl
Teil 2	
M-MLV RT 5 × Puffer (II.1.9)	5 µl
RNasin® Plus RNase Inhibitor (40 U/µl; II.1.9)	1 µl
M-MLV RT (200 U/µl; II.1.9)	1 µl

Die Komponenten aus Tabelle 16 Teil 1 wurden vorsichtig in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt, 5 min bei 65°C erhitzt und mindestens 1 min auf Eis gekühlt. Nach einer kurzen Zentrifugation (kurzer Lauf, 4°C) um alle Komponenten aus Teil 1 der reversen Transkription zu sammeln, wurden die Komponenten aus Tabelle 16 Teil 2, ergänzt, gemischt und bei 50°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen bei 70°C für 15 min inaktiviert. Die Qualität und Quantität der cDNA wurde unter Verwendung von NanoDrop überprüft und bei -20°C gelagert.

4.1.4 Polymerase-Kettenreaktion

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion können gezielt gewünschte DNA-Fragmente amplifiziert werden. Basierend auf verschiedenen Anwendungen mit der amplifizierten DNA und den damit einhergehenden Anforderungen, wurden verschiedene Polymerasen mit verschiedenen Ansätzen (Reaktionsreagenzien, Primer, Tabelle 17, II.1.9) und PCR-Programmen eingesetzt (Tabelle 18, II.3.1). Es wurde immer jeweils eine Negativkontrolle mit bidest. Wasser anstatt Matrizen-DNA mitgeführt. *Taq* DNA Polymerase wurde vor allem zur Kontrolle der korrekten Ligation eines DNA-Fragmentes eingesetzt, welche auch im Zuge der Kolonie-PCR durchgeführt wurde. Durch die Kolonie-PCR wurde die erfolgreiche Transformation in *E. coli* untersucht.

Phusion[®] high-fidelity DNA Polymerase wurde vor allem wegen ihrer 3' → 5'-Exonuklease Aktivität und der damit verbundenen niedrigen Synthese-Fehlerrate vor allem für gezielte Gen-Amplifikationen aus pflanzlicher cDNA für eine anschließende Klonierung und heterologe Expression eingesetzt. Die Schmelztemperatur (T_m) und Elongationszeiten der PCR-Programme wurden jeweils an die verwendeten Primerpaare und die zu erwartende Länge des PCR-Produktes angepasst.

Tabelle 17 PCR Ansätze für *Phusion*[®] high-fidelity DNA Polymerase und *Taq* DNA Polymerase

<i>Phusion</i> [®] high-fidelity DNA Polymerase	<i>Taq</i> DNA Polymerase
5 µl 5 × GC oder HF Puffer	2,5 µl 10 × ThermoPol Puffer
1 µl (10 µM Stammlösung) dNTPs	1 µl (10 µM Stammlösung) dNTPs
1 µl (10 µM Stammlösung) <i>forward</i> -Primer	1 µl (10 µM Stammlösung) <i>forward</i> -Primer
1 µl (10 µM Stammlösung) <i>reverse</i> -Primer	1 µl (10 µM Stammlösung) <i>reverse</i> -Primer
1 µl Matrizen-DNA/bidest. Wasser	1 µl Matrizen-DNA/Bakterienzelle/bidest. Wasser
0,2 µl <i>Phusion</i> [®] DNA Polymerase	0,2 µl <i>Taq</i> DNA Polymerase
Mit bidest. Wasser auf 25 µl auffüllen	Mit bidest. Wasser auf 25 µl auffüllen

Tabelle 18 Allgemeines PCR-Programm

PCR Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklus
Initiale Denaturierung	94°C	5 min	1
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	T_m (50-60°C)	30 sec	35
Elongation	72°C	1,5 min (1 kb/min)	
Finale Elongation	72°C	10 min	1
Lagerung	4°C	∞	1

Die korrespondierenden Sequenzen des offenen Leserahmens der drei Isoformen von Fra a 1 (Fra a 1.01E-1.03) und FaAP wurden aus cDNA von *F. xananassa* cv. Elsanta unter Verwendung von genspezifischen Primern (II.1.8.3) und *Phusion*[®] high-fidelity DNA Polymerase amplifiziert.

4.1.5 Agarosegelelektrophorese

Die geeignete Menge für ein 1 oder 2%-iges (w/V) Agarosegel wurde in Abhängigkeit von der gewünschten Trennungseffizienz in einem 250 ml Kolben mit 1 × TAE Puffer (II.1.10.2) gemischt und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung der Agarose erhitzt. Die Mischung wurde auf ca. 60°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid oder Roti[®]-Safe GelStain in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml versetzt und gemischt. Die Agaroselösung mit dem Färbereagenz wurde in die Gelschale gegossen und ein oder zwei Kämmen wurden entweder in die Oberseite des flüssigen Agarosegels oder in die Oberseite und die Mitte der Gelschale gesteckt. Das polymerisierte Agarosegel wurde nach ca. 20 min in einen Geltank überführt und mit 1 × TAE Puffer gefüllt, bis das Agarosegel bedeckt war. DNA Proben wurden vor dem Auftragen auf das Agarosegel mit 1 × DNA Ladepuffer (II.1.10.2) gemischt und ein geeigneter DNA-Marker (II.1.12; 5 µl) wurde in Abhängigkeit von der individuell erwarteten DNA-Fragmentgröße für die gelelektrophoretische Trennung in die Geltaschen gegeben. Die Stromversorgung wurde über 25 min auf 100-120 V eingestellt. Die gelelektrophoretisch klar getrennten DNA-Fragmente wurden basierend auf der Interkalation (Ethidiumbromid) oder den DNA-Bindungseigenschaften (Roti[®]-Safe GelStain) an den DNA-Helices und der anschließenden Lichtemission unter Verwendung einer UV-Box (II.3.1) visualisiert.

4.1.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Die unter UV-Licht visualisierten und ausgeschnittenen DNA-Agarosegelfragmente wurden entweder unter Verwendung des NucleoSpin[®] Gel- und PCR Clean-up Kits oder des PCR Clean-up QIAquick[®] Gelextraktionskits (II.1.11) nach Herstellervorschrift aufgereinigt. Die DNA-Gel-Lösung wurde zweimal

auf die Säulenmembran geladen. Die DNA wurde mit einer geeigneten Menge (20-40 µl) von 50°C vorgewärmtem Wasser eluiert und schließlich bei -20°C gelagert.

4.1.7 Restriktion von DNA mittels Endonukleasen

Für einen vollständigen Verdau des spezifischen DNA-Fragmentes (GOI), des Zielvektors oder einer Test-Restriktionsendonuklease-Reaktion wurden die aufgelisteten Komponenten in Tabelle 19 gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert.

Tabelle 19 Ansatz für die Restriktion von DNA mittels Endonukleasen

Komponenten	Menge (1-facher Ansatz)
GOI, Vektor-DNA, Plasmid-DNA (1-5 µg)	x µl
10 × Fast Digest (FD) Puffer	1,5 µl
Restriktionsenzym 1	0,5 µl
Restriktionsenzym 2	0,5 µl
Reaktionsvolumen	Mit bidest. Wasser auf 15 µl auffüllen

Die DNA-Fragmente und Zielvektoren, welche einer restriktiven Spaltung mittels Endonukleasen unterzogen wurden, wurden erneut mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, dokumentiert, ausgeschnitten, aufgereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert (II.4.1.5; II.4.1.6). Die Test-Restriktionsendonuklease-Reaktion wurde ebenfalls mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und dokumentiert (II.4.1.5).

4.1.8 Ligationsreaktion

Methode I

Das vorverdaute spezifische DNA-Fragment (GOI) und der ebenfalls mit den gleichen Restriktionsenzymen vorverdaute und aufgereinigte Zielvektor wurden mit den in Tabelle 20 aufgeführten Komponenten gemischt, 45 min bei RT und zusätzlich über Nacht bei 4°C inkubiert. Es wurde jeweils immer eine Negativkontrolle mit bidest. Wasser anstatt des vorverdauten GOI's mitgeführt. Das Verhältnis zwischen dem spezifischen DNA-Fragment (GOI) und dem Zielvektor in der Ligationsreaktion wurde wie in der folgenden Gleichung beschrieben berechnet.

$$x \text{ ng Insert} = ((x \text{ ng Vektor} \times x \text{ kb GOI}) \div x \text{ kb Vektor}) \times 0.3$$

Tabelle 20 Ligationsreaktion Methode I

Komponenten	Menge
10 × T4 DNA Ligase Reaktionspuffer	1 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
vorverdauter Zielvektor (20 ng/µl)	ca. 2,5 µl
vorverdautes GOI (50 ng/µl)/bidest. Wasser	ca. 5 µl
Reaktionsvolumen	Mit bidest. Wasser auf 10 µl auffüllen

Methode II

Für das A-Tailing des gereinigten PCR-Produktes des spezifischen DNA-Fragmentes (GOI) wurde dieses zunächst mit 10 × ThermoPol-Puffer (MgCl₂), *Taq* DNA Polymerase und dATP (2 mM; II.1.9) gemischt und bei 72°C für 30 min inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde durch die *Taq* DNA Polymerase ein 3'-d(A)-Überhang an den Enden des PCR-Produktes generiert. Die Überhänge sind komplementär zu dem 3'-d(T)-Überhang des linearen pGEM[®]-T Easy Shuttlevektors (II.1.6). Dieses System der komplementären 3'-Überhänge erlaubt eine effiziente Ligation der beiden DNA-Fragmente. Der gesamte A-Tailing Ansatz und der lineare Vektor pGEM[®]-T Easy wurden mit den in Tabelle 21 aufgeführten Komponenten gemischt und 1 h bei RT inkubiert. Es wurde jeweils immer eine Negativkontrolle mit bidest. Wasser anstatt das A-Tailing Ansatzes mitgeführt.

Tabelle 21 Ligationsreaktion Methode II

Komponenten	Menge
2 × T4 DNA Ligase Puffer	5 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
pGEM®-T Easy	1 µl
A-Tailing Ansatz des GOI (50 ng/µl; bidest. Wasser)	ca. 3 µl

4.1.9 Herstellung von chemo-kompetenten *E. coli*-Zellen

Zwanzig ml LB-Medium (II.1.10.1) wurde mit einer einzelnen Kolonie eines *E. coli*-Stammes (*E. coli* NEB 10ß oder *E. coli* BL21 (DE3) pLysS) inokuliert und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator bei 150 rpm inkubiert. Zur Herstellung von chemo-kompetenten *E. coli*-Zellen von dem Stamm BL21 (DE3) pLysS wurde ein LB-Selektionsmedium mit Chloramphenicol verwendet. Für den *E. coli* Stamm NEB 10ß wurde reines LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotikum verwendet. Ein Milliliter einer Über-Nacht-Kultur wurde mit 99 ml LB-Medium verdünnt, einschließlich, wenn notwendig, geeigneter Antibiotika und bei 37°C und 150 rpm im Schüttelinkubator geschüttelt, bis die Bakterienkultur eine optische Dichte 600 (OD₆₀₀) von 0,5 erreicht hatte. Die Bakterienkultur wurde 30 min in Eiswasser getaucht. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (15 min, 5.000 rpm, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet sorgfältig in 5 ml Triturationspuffer (II.1.10.2) gelöst und schließlich in 40 ml Triturationspuffer gewaschen. Nach einer zusätzlichen Inkubation in Eiswasser für 15 min wurden die Zellen erneut mittels Zentrifugation (15 min, 5.000 rpm, 4°C) pelletiert und mit 40 ml Triturationspuffer gewaschen. Nach dem abschließenden Zentrifugationsschritt (15 min, 5.000 rpm, 4°C) wurden die Zellen in 10 ml Triturationspuffer gelöst und mit 7% DMSO (V/V) gemischt. 200 µl Aliquots in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.1.10 Herstellung und Transformation von chemo-kompetenten *S. cerevisiae* Zellen

Die chemo-kompetenten *S. cerevisiae* Zellen des Stammes Y190 wurden hergestellt und transformiert, wie in den Anweisungen des Herstellers beschrieben unter Verwendung des *S. c.* EasyComp.™ Transformationskit zur Herstellung und Transformation von chemo-kompetenten *S. cerevisiae* Zellen (II.1.11). Die Selektion von erfolgreich transformierten Hefezellen fand auf den jeweiligen Hefe-Minimalmedien (II.1.10.1) statt. Hierfür wurden 100 µl des Transformations-Ansatzes auf Festmedium ausplattiert und für mindestens 48 h bei 28-30°C inkubiert. Von den transformierten Hefezellen, welche auf dem jeweiligen Minimalmedium wachsen konnten und somit die im Minimalmedium fehlende Aminosäure selbst herstellen konnten, wurde eine Über-Nacht-Kultur mit dem jeweiligen Minimalmedium kultiviert, eine Glycerin-Dauerkultur hergestellt (II.4.1.13) und bei -80°C bis zum späteren Gebrauch tiefgefroren. Es wurden folgende verifizierte und korrekte Konstrukte in chemo-kompetente *S. cerevisiae* Zellen des Stammes Y190 transformiert: pGADT7-Fra a 1.01E/Fra a 1.02/Fra a 1.03/FaAP/FaAP-N/FaAP-C/Mal d 1/MdAP und pGBT7-Fra a 1.01E/Fra a 1.02/Fra a 1.03/FaAP/FaAP-N/FaAP-C/Mal d 1/MdAP.

4.1.11 Hitzeschock Transformation von chemo-kompetenten *E. coli* Zellen

Bei -80°C gefrorene *E. coli* Zellen (*E. coli* NEB 10ß bzw. *E. coli* BL21 (DE3) pLysS) wurden langsam (10 min) auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 10 µl eines Ligationsansatzes oder 1 µg - 100 ng Plasmid-DNA gemischt. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert, 45 sec bei 42°C einem Hitzeschock im Wasserbad ausgesetzt und erneut 5 min ohne Mischen auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 950 µl SOC-Medium (II.1.10.1; RT) versetzt und 1 h bei 37°C unter Schütteln bei 150 rpm inkubiert. Die transformierten Zellen wurden durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (3 min, 4.000 rpm, 4°C) am Boden des 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßes gesammelt, 100 µl auf LB-Selektionsplatten mit den Plasmid-spezifischen Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurden folgende verifizierte und korrekte Konstrukte (GOI) in chemo-kompetente *E. coli* Zellen (*E. coli* NEB 10ß und *E. coli* BL21 (DE3) pLysS) transformiert: pQE70-Fra a 1.01E bis Fra a 1.08, pET28b-FaAP-eGFP und pET28b-

eGFP. Die Konstrukte zu den Isoformen pQE70-Fra a 1.04 bis Fra a 1.08 wurden freundlicherweise von Frau Dr. Fatma Besbes (BiNa, WZW, TUM) zur Verfügung gestellt.

4.1.12 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von spezifisch hergestellten DNA-Konstrukten wurde zur Verifizierung der DNA-Sequenz, der korrekten Orientierung des DNA-Fragmentes im Vektor und der korrekten Insertion bezüglich der Lage des DNA-Fragmentes im Leseraster zu dem vorhandenen His-tag des Vektors an MWG Eurofins (Ebersberg, Deutschland) geschickt. Die Sequenzierungsprimer wurden entweder zu jeder Probe (10 pmol/ μ l) hinzugegeben (II.1.8.3) oder Standardprimer (II.1.8.1) wurden direkt vor der Sequenzierung durch MWG Eurofins ergänzt.

4.1.13 Isolation von Plasmid-DNA und Herstellung von Glycerin Dauerkulturen

Nach einer positiven Kolonie-PCR-Reaktion (II.4.1.4) wurden die entsprechenden Kolonien von der LB-Selektionsplatte gepickt und mit 15 ml LB-Medium, einschließlich 15 μ l der jeweiligen Plasmid-spezifischen Antibiotika, bei 37°C unter Schütteln bei 150 rpm über Nacht inokuliert. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde, wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben, mit dem PureYield™ Plasmid Miniprep System Kit (II.1.11) durchgeführt. Nach einer Test-PCR (II.4.1.4), einer Test-Restriktionsanalyse (II.4.1.7) und einer DNA-Sequenzierung (II.4.1.12), welche die korrekte Insertion des DNA-Fragmentes belegte, wurde eine Glycerin-Stammlösung (II.1.10.3) für die Langzeitlagerung der positiven *E. coli* Kolonien hergestellt. Sieben Hundert μ l Zellkultur des positiven Klons und 700 μ l Glycerin Stammlösung (II.1.10.3; 1:1, V/V) wurden durch sorgfältiges Vortexen in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.1.14 Kultivierung und Expression von rekombinanten Proteinen

Zur heterologen Expression des „genes of interest“ (GOI) wurde eine 15 ml LB-Medium Über-Nacht-Kultur mit den jeweiligen Plasmid-spezifischen Antibiotika und einer Einzelkolonie oder einigen Zellen aus der Glycerin-Dauerkultur aus dem *E. coli* Expressionsstamm BL21 (DE3) pLysS, welcher das Plasmid mit dem GOI beinhaltet, hergestellt und bei 37°C unter Schütteln bei 150 rpm über Nacht kultiviert. Ein Liter LB-Medium mit den jeweiligen Plasmid-spezifischen Antibiotika wurde mit der Über-Nacht-Kultur inokuliert und bei 37°C unter Schütteln bei 150 rpm kultiviert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht wurde. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG (II.1.10.3; 1 mM Endkonzentration) induziert. Die induzierte Bakteriensuspension wurde 24 h bei 18°C unter Schütteln bei 150 rpm inkubiert. Die Bakterienkultur wurde durch Zentrifugation (10 min, 5.000 rpm, 4°C) geerntet, einmal mit frischem LB-Medium gewaschen, in ein 50 ml-Falkon-Reaktionsgefäß überführt und mit einem Festwinkelrotor (10 min, 5.000 rpm, 4°C) zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstands wurde das Pellet sofort bis zum späteren Gebrauch aber mindestens 30 min bei -80°C tiefgefroren.

4.1.15 Proteinisolation aus *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen

Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Zellpellet wurde nach mindestens 30 min bei -80°C auf Eis gelagert und in 8 ml 1 × His-tag Wasch-/Bindepuffer (II.1.10.2) und 8 μ l PMSF (II.1.10.3; 1 mM Endkonzentration) durch Vortexen vollständig resuspendiert. PMSF blockiert irreversibel die Aktivität von Serinproteasen, welche während der Zellzerstörung freigesetzt werden und das heterolog exprimierte Protein abbauen würden (Fahrney and Gold 1963). Der Zellaufschluss erfolgte unter Verwendung eines pulsierenden Ultraschallhomogenisators (1 min, 50% Leistung, auf Eis) mit dreimaliger Wiederholung. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (20 min, 12.000 rpm, 4°C) entfernt. Der Gesamtproteingehalt, einschließlich des heterolog exprimierten Proteins befand sich im Überstand.

4.1.16 Aufreinigung des His-tag fusionierten Proteins mittels Affinitätschromatographie

Die manuelle Aufreinigung des heterolog exprimierten Proteins mit einem 6× His-tag wurde mittels „Immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie“ (IMAC) durchgeführt. Der C-terminal an Fra a 1 Isoformen und N-terminal an FaAP gebundene 6× His-tag bindet reversibel an die am Profinity™ IMAC Resin chelatisierten Nickelionen. Durch die anschließende Elution mit einem Imidazol-haltigen

Elutionspuffer wird das an das Resin gebundene Protein kompetitiv von der Matrix verdrängt und eluiert.

Eine Chromatographiesäule für die manuelle Proteinaufreinigung wurde mit 500 µl Profinity™ IMAC Ni-charged Resin befüllt und zweimal mit je 5 ml His-tag Wasch-/Bindepuffer (II.1.10.2) äquilibriert. Die Rohproteinlösung mit dem Gesamtproteingehalt wurde auf die äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde oben und unten verschlossen und mindestens 1 h bei 4°C drehend inkubiert. Nach der Bindung des His-tag fusionierten Proteins wurde das Zellysate entfernt und die Säule zweimal mit jeweils 10 ml His-tag Wasch-/Bindepuffer gewaschen. Zur Elution wurden 300 µl des His-tag Elutionspuffers (II.1.10.2) direkt auf die Oberseite des Resins gegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Das eluierte Protein wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt und weiterhin auf Eis gelagert. Der Elutionsschritt wurde zweimal wiederholt. Somit lagen final je drei 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit je 300 µl Eluat vor. Die Säule mit dem Profinity™ IMAC Ni-charged Resin wurde einmal mit 10 ml His-tag Wasch-/Bindepuffer und einmal mit 10 ml 20% Ethanol gewaschen. Fünf ml 20% Ethanol wurden in der Säule für die Lagerung belassen. Die Säule wurde oben und unten sorgfältig verschlossen und bei 4°C gelagert.

4.1.17 Regeneration des Profinity™ IMAC Ni-charged Resins

Das mit Metallionen angereicherte Ni-charged Resin von Profinity™ IMAC kann mehrmals zur Proteinaufreinigung verwendet werden, bevor es notwendig wird, das Resin mit Nickelionen erneut zu beladen. Das Resin in der Chromatographiesäule wurde mit 10 ml His-tag Resin Regenerationslösung (II.10.3) äquilibriert. Das Resin wurde mit 30 ml NiCl₂ Lösung (II.1.10.3) bei 4°C für 10 min invertiert. Die NiCl₂ Lösung wurde entfernt und das Resin wurde mit 50 ml His-tag Resin Regenerationslösung und 100 ml bidest. Wasser gewaschen und mindestens mit 50 ml His-tag Wasch-/Bindepuffer äquilibriert.

4.1.18 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford Methode bestimmt (Bradford 1976). Zwei bis zehn µl der Zellysate-, Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen wurden mit bidest. Wasser auf 100 µl aufgefüllt, jeweils mit 1 ml Bradford Lösung (II.1.10.3) versetzt und gemischt. Als Negativkontrolle wurden 2-10 µl His-tag Elutionspuffer mit bidest. Wasser auf 100 µl aufgefüllt und mit 1 ml Bradford Lösung gemischt. Nach Inkubation bei RT für 5 min wurde die Proteinkonzentration spektrophotometrisch bei 595 nm gegen die Blindprobe (Negativkontrolle) bestimmt.

Für jede neu angesetzte Bradford Lösung wurde eine neue Kalibrierkurve (Bereich: 0-20 µg) mit Standard-BSA durchgeführt.

Die Proteinmenge wurde wie in der folgenden Gleichung beschrieben unter Verwendung der Steigung der linearen Kalibrierkurve, der Absorption bei 595 nm und des Volumens der gemessenen Probe berechnet (eingesetzte Zahlen stellen lediglich ein Beispiel dar).

$$Protein\ c\ [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{((A_{595} + 0.0425) \div 0.0483)}{Probe\ V\ [\mu\text{l}]}$$

4.1.19 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ein SDS-Polyacrylamidgel bestehend aus einem 12%-igen Trenngel und einem 7%-igen Sammelgel (II.1.10.3) wurde gegossen, nach der vollständigen Polymerisierung in den Geltank gegeben und mit 1 × SDS-Laufpuffer (II.1.10.2) bedeckt. Fünf bis zehn µg rekombinantes Protein oder auch Fraktionen der verschiedenen Aufreinigungsschritte wurden vor dem Auftragen mit 1 × denaturierenden Roti®-Load 1 gemischt und zur Denaturierung 5 min auf 95°C erhitzt. Durch einen kurzen Zentrifugationsschritt wurden die denaturierten Proteinproben am Boden des 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßes gesammelt. Die präparierten Proteinproben und 8 µl des Proteinmarkers PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (II.1.12) wurden jeweils in die mittels eines Kammes im Sammelgel hergestellten Vertiefungen geladen. Die Stromversorgung wurde auf 120 V eingestellt. Die Elektrophorese wurde bei RT durchgeführt bis die blaue Beladungsfarbstofffront den unteren Rand der SDS-PAGE erreicht hatte (ca. 1,5 h).

Die Proteine wurden in Abhängigkeit von ihrer molekularen Masse unter reduzierenden Bedingungen getrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden in der SDS-PAGE entweder mittels

Coomassie Färbung (II.4.1.21) oder Silberfärbung (II.4.1.22) visualisiert und/oder anschließend einer Western Blot Analyse (II.4.1.26) unterzogen. Durch diese Vorgehensweise konnte nicht nur ermittelt werden, ob das gewünschte Protein mit dem 6× His-tag der berechneten Konzentration vorhanden war, sondern auch, ob das Protein in reiner Form ohne Verunreinigungen durch andere Proteine in der Elutionsfraktion vorlag.

Die Proteine der acht rFra 1 Isoformen, FaAP-eGFP und eGFP waren bereits in der Rohextrakt-, Durchfluss- und Waschfraktion eines SDS-Polyacrylamidgeles auf der Höhe von ca. 18 kDa bzw. ca. 49 kDa und 27,5 kDa deutlich sichtbar, wenn dieses mit Coomassie Brilliant Blue G-250 (II.4.1.16, II.4.1.18, II.4.1.19, II.4.1.21) visualisiert wurde. Dies deutet auf eine starke und erfolgreiche heterologe Expression des gewünschten Proteins hin. Die mittels Affinitätschromatographie aufgereinigten und eluierten rFra a 1, FaAP-eGFP und eGFP Proteine wiesen einen hohen Reinheitsgrad von >95% auf und die Größe der exprimierten Proteine stimmte gut mit der vorhergesagten Proteingröße von etwa 18 kDa bzw. 49 kDa und 27,5 kDa (II.1.2, Tabelle 3) überein.

4.1.20 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ein Natives Polyacrylamidgel bestehend aus einem 10%-igen Trenngel und einem 7%-igen Sammelgel (II.1.10.3) wurde gegossen, nach der vollständigen Polymerisierung in den Geltank gegeben und mit Native-PAGE Laufpuffer (II.1.10.2) bedeckt. Zehn, 20, 30, 40, 45 und 50 µg gereinigtes, natives, rekombinantes Protein wurden mit 4 × nativen Laemmli Puffer (II.1.10.2) gemischt und weiterhin auf Eis gelagert. Durch einen kurzen Zentrifugationsschritt wurden die Proteinproben am Boden des 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßes gesammelt. Die präparierten Proteinproben und 8 µl des nativen Proteinmarkers Native Marker Liquid Mix for BN/CN (II.1.12) wurden jeweils in die mittels eines Kammes im Sammelgel hergestellten Vertiefungen geladen. Die Stromversorgung wurde auf 20 mA und 100 V eingestellt und die Elektrophorese wurde bei 4°C durchgeführt bis die blaue Beladungsfarbstofffront den unteren Rand des nativen Trenngels erreicht hatte (ca. 4 h).

Die Proteine wurden unter nicht-denaturierenden Bedingungen in Abhängigkeit von vielen Faktoren, einschließlich Größe, Form und natürlicher Ladung, getrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden in der Nativen PAGE entweder mittels Coomassie Färbung (II.4.1.21) oder Silberfärbung (II.4.1.22) visualisiert und/oder anschließend einer Western Blot Analyse (II.4.1.26) unterzogen. Durch diese Vorgehensweise konnte ermittelt werden, ob das rekombinante Protein im nativen Zustand zum Beispiel konzentrationsabhängig in Form eines Dimers oder Oligomers vorliegt.

4.1.21 Coomassie Färbung von Polyacrylamidgelen

Das Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinen wurde 10 min in bidest. Wasser gewaschen und über Nacht bei 50 rpm in der Coomassie Färbelösung (II.1.10.3) bei RT inkubiert. Native-PAGEs wurden während des Färbvorgangs bei 4°C inkubiert. Das vollständig gefärbte Polyacrylamidgel wurde durch die Inkubation in einer Coomassie Entfärbungslösung (II.1.10.3) bei RT für 1,5 h unter Schütteln bei 50 rpm entfärbt bis das endgültige Färbergebnis erreicht war. Native-PAGEs wurden auch während des Entfärbvorgangs bei 4°C inkubiert. Das mittels Coomassie gefärbte Polyacrylamidgel wurde zur Dokumentation gescannt, eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

4.1.22 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Zum Nachweis der aufgetrennten Proteine wurde die hochsensitive Färbemethode Silberfärbung eingesetzt (Blum, Beier et al. 1987). Die Lösungen für die Silberfärbung mussten frisch zubereitet werden, um sichere und reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten. Alle Schritte wurden unter leichtem Schütteln bei 50 rpm durchgeführt. Die Silberfärbung von Nativen PAGEs wurde bei 4°C durchgeführt.

Die aufgetrennten Proteine auf dem Polyacrylamidgel wurden in der Fixierlösung (II.1.10.3) bei RT über Nacht inkubiert. Das Gel wurde zweimal mit der Waschlösung (II.1.10.3) für je 20 min und anschließend für 20 min in bidest. Wasser gewaschen. Das bidest. Wasser wurde durch die Thiosulfatlösung (II.1.10.3) ersetzt und 1 min inkubiert. Das Gel wurde dreimal für je 15 sec mit bidest. Wasser gewaschen und für die Silberfärbung 20 min (nicht länger) in der Silbernitratlösung (II.1.10.3) inkubiert.

Das Gel wurde erneut dreimal für je 20 sec mit bidest. Wasser gewaschen. Zum Nachweis der Proteinbanden wurde das Polyacrylamidgel in der Entwicklungslösung (II.1.10.3) inkubiert bis das gewünschte Ergebnis erreicht war (5-10 min). Die Färbereaktion wurde durch eine Inkubation des Geles in 5%-iger Essigsäure gestoppt. Anschließend wurde das Gel zweimal mit bidest. Wasser für je 30 min gewaschen und zur Konservierung in der Konservierungslösung (II.1.10.3) über Nacht inkubiert. Das mittels Silberfärbung visualisierte Polyacrylamidgel wurde zur Dokumentation gescannt, eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

4.1.23 Sequenzierung von Proteinbanden

Die Sequenzierung von Proteinbanden wurde in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Proteomik und Bioanalytik (Prof. Dr. Bernhard Küster, WZW, TUM) durchgeführt.

Die Proteinbanden, welche basierend auf deren Laufhöhe in der Nativen PAGE ein Molekulargewicht von ca. 17 kDa aufwiesen, wurden aus der silbergefärbten Nativen PAGE ausgeschnitten. Nach einem tryptischen Verdau der Proteine wurden diese mittels Flüssigchromatographie-Tandem-MS (LC-MS/MS) untersucht. Die Massenspektrometrie wurde mit einem LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer (II.3.1) und die Flüssigchromatographie mit einem nanoLC Ultra 1D (II.3.1) unter Verwendung einer hauseigenen gepackten Vorsäule (20 mm × 75 µm ReproSil-Pur C18; II.3.2) und einer analytischen Säule (400 mm × 50 µm ReproSil-Pur C18; II.3.2) durchgeführt. Nach einem 10-minütigen Beladen mit dem Injektionsvolumen von 5 µl und einem Waschvorgang wurden die Peptide in die analytische Trennsäule überführt und unter Verwendung eines 45-minütigen Gradienten von 2% bis 35% Puffer B (0,1% Ameisensäure in Acetonitril) bei einer Flussrate von 300 nl/min getrennt. Das Massenspektrometer war mit einer Nano-Elektrospray-Ionenquelle (Proxeon Biosystems, Odense C, Dänemark) ausgestattet. Die Spannung der Nano-Elektrospray-Ionenquelle wurde über ein Diffusionspotential angelegt. Das Massenspektrometer wurde in einem datenabhängigen Modus betrieben und alle Messungen wurden bei einer positiven Polarität der Ionen durchgeführt. Intakte Peptidmassenspektren wurden bei einer Auflösung von 60.000 (bei m/z 400) und einem automatischen *gain control* (AGC) mit dem Zielwert von 10^6 erhalten, gefolgt von einer Fragmentierung der am häufigsten vorkommenden Ionen mittels Kollision-induzierter Dissoziation (*collision-induced dissociation* (CID)). Vollständige Scans wurden im Profilmodus aufgenommen, während alle Tandem-Massenspektren im Centroid-Modus erfasst wurden. Die Kollision-induzierte Dissoziation wurde für bis zu 8 MS/MS mit einem vollständigen Scan von 35% normalisierter Kollisionsenergie (*normalized collision energy* (NCE)) und einer AGC mit dem Zielwert von 5.000 durchgeführt. Es wurden sowohl einfach geladene Ionen, Ionen ohne zugeordneten Ladungszustand und fragmentierte Vorläuferionen (10 sec) dynamisch von der Fragmentierung ausgeschlossen. Die interne Kalibrierung wurde mittels eines Poly-Siloxan-Ionensignals von m/z 445,1200 in normaler Laborumgebung durchgeführt.

4.1.24 Quantifizierung und Identifizierung von Peptiden und Proteinen

Peak-Listen wurden aus Dateien von Roh-MS-Daten mit Mascot Distiller v2.4.3.1 (II.2) erstellt und auf die Genomsequenz der diploiden Erdbeere *F. vesca* 'Hawaii 4' (Shulaev, Sargent et al. 2011) und cDNA-Sequenzierungsergebnissen von Fra a 1.01E-1.08, kloniert aus *F. xananassa* cv. Elsanta, durchsucht. Die Suche ermöglichte Kontaminationen und die umgekehrte Version aller Sequenzen mit den folgenden Parametern zu identifizieren: Carbamidomethylierung von Cysteinresten als fixierte Modifikation und Acetyl- (N-terminale Proteinmodifikation) und Methioninoxidation als variable Modifikationen. Trypsin wurde als das proteolytische Enzym spezifiziert und bis zu zwei fehlende Spaltungen waren erlaubt. Die Massentoleranz des Vorläuferions wurde auf 20 ppm und für die Fragmentierungen auf 0,5 Da eingestellt. Die Dateninterpretation wurde unter Verwendung von Scaffold 4, v.4.2.1.39, durchgeführt. Alle Proteine wurden unter einer „false discovery rate“ von 0,0% gefiltert.

4.1.25 Fra a 1.02-spezifischer polyklonaler Antikörper

Der polyklonale Fra a 1.02-spezifische Antikörper wurde mittels einer Immunisierung von zwei Kaninchen mit gereinigtem rekombinantem Fra a 1.02 Protein in einem 88-Tage-Protokoll hergestellt.

Mit der Antikörperproduktion wurde die Firma Coring System Diagnostix GmbH (Gernsheim, Deutschland) beauftragt, welche die Herstellung des Antikörpers wiederum an die Firma Covalab (Villeurbanne, Frankreich) aufgrund des Tierschutzgesetzes in Frankreich vergab. Der polyklonale Antikörper wurde unter Verwendung von Protein A-Sepharosekügelchen gereinigt, in 1 × PBS mit 0,02% Natriumazid eluiert und bei 4°C gelagert.

4.1.26 Western Blot Analyse

Eine Western Blot Analyse wurde durchgeführt, um rekombinante Proteine von Interesse mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachzuweisen, die sowohl über ein denaturierendes als auch über ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden. Die PVDF-Membran (II.3.2) und acht Filterpapiere (II.3.2) wurden auf die Größe des Polyacrylamidgeles zugeschnitten. Die Filterpapiere wurden 15 min in Semi-Dry-Blotting Puffer (II.1.10.2) eingeweicht bis sie vollständig mit Semi-Dry Blotting Puffer vollgesogen waren. Bevor die Proteine vom Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran übertragen wurden, wurde diese einer Hydrophilisierung unterzogen, indem die Membran 1 min in Methanol inkubiert und 10 min in Semi-Dry-Blotting Puffer äquilibriert wurde. Das Polyacrylamidgel wurde ebenfalls einer Äquilibrierung für 15 min in Semi-Dry-Blotting Puffer unterzogen. Von Anode zu Kathode wurden die Komponenten des Western Blots wie beschrieben angeordnet: vier Filterpapiere, PVDF-Membran, SDS oder Natives Polyacrylamidgel, vier Filterpapiere. Störende Luftblasen wurden vorsichtig entfernt. Die anzulegende Stromstärke wurde, wie in der folgenden Gleichung beschrieben, berechnet.

$$x \text{ mA} = \text{Fläche des Geles [cm}^2\text{]} \times 0.8$$

Die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran wurde mit der berechneten Stromstärke und einer Spannung von 15 V für 1 h durchgeführt. Die Proteine wurden durch die Bildung von Ionenbindungen an die Membran gebunden. Nach dem Blotten wurde die Membran in Blocking Puffer (II.1.10.2) unter Schütteln bei 50 rpm für 1 h inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit Washing Puffer (II.1.10.2) für je 10 min gewaschen. Anschließend wurde die gewaschene Membran in dem jeweiligen, mit Blocking Puffer verdünnten primären Antikörper (II.1.13) bei 4°C unter Schütteln (50 rpm) für 1 h inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal mit Washing Puffer für 10 min gespült und mit dem jeweiligen in Blocking Puffer verdünnten sekundären Antikörper (II.1.13) erneut bei 4°C unter Schütteln (50 rpm) für 1 h inkubiert. Vor der Detektion des Proteins von Interesse wurde die Membran dreimal mit Washing Puffer für 10 min und zweimal mit Detection Puffer (II.1.10.2) für 5 min gewaschen. Der Detection Puffer wurde für die Detektion kurz vor der Nutzung mit den Substraten NBT und BCIP (II.1.10.3) gemischt. Zur Detektion wurde die Membran in dem Detection Puffer mit den Substraten im Dunkeln unter Schütteln (50 rpm) inkubiert. Die Membran wurde bis zum Erreichen des gewünschten Ergebnisses, aber nicht länger als 15 min, inkubiert. Die alkalische Phosphatase, welche an dem sekundären (oder primären) Antikörper konjugiert ist (II.1.13), wandelt beide Substrate in ein indigoblaues Signal um. Die Reaktion wurde durch Waschen der Membran mit bidest. Wasser gestoppt, wodurch das restliche Substrat entfernt wurde. Das Ergebnis wurde durch Scannen der PVDF-Membran dokumentiert.

Auch durch die Western Blot Analyse konnte die starke und erfolgreiche heterologe Expression der gewünschten Proteine (rFra 1 Isoformen, FaAP-eGFP und eGFP), der hohe Reinheitsgrad von >95% und die Größe der exprimierten Proteine von etwa 18 kDa bzw. 49 kDa und 27,5 kDa (II.1.2, Tabelle 3) bestätigt werden.

4.1.27 Allergen-induzierter Basophilen Aktivierungstest (BAT)

4.1.27.a Zellsortierung mittels Fluoreszenz (FACS): Allgemein

Der Allergen-induzierte Basophilen Aktivierungstest ist ein zelluläres *in vitro* Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung des Oberflächenmarkers CD63. Das Glykoprotein CD63 wird in hoher Dichte

auf der Zellmembranoberfläche auf aktivierten basophilen Granulozyten nach Stimulation mit Allergenen exprimiert. Basophile Granulozyten repräsentieren nur 0,5-1% der zirkulierenden Leukozyten im Blut und somit der Gesamtblutzellenpopulation.

Die Durchflusszytometrie wurde zur quantitativen Bestimmung angewendet. Die Durchflusszytometrie bietet einige Vorteile sowie die Möglichkeit, molekulare Parameter auf der Zelloberfläche zu identifizieren, die spezifischen Eigenschaften der Zelle wiederzugeben und ist zudem eine hochempfindliche und hochspezifische Analysemethode (Sainte-Laudy, Sabbah et al. 2000). Für die Aktivierung der Zellen wird eine Argonlaserdiode mit einer Wellenlänge von 488 nm eingesetzt.

4.1.27.b Untersuchungsmaterial: rekombinante Proteine

Das Auswahlkriterium der Probanden war deren Typ-I Allergie gegen Birkenpollen. Somit wurde das rekombinante Protein Bet v 1a (*Betula verrucosa* 1a; (Schober, Belloni et al. 2006); II.1.9) als Positivkontrolle in der Untersuchung eingesetzt.

Die Erdbeerallergene rFra a 1.01E-1.08 und der leere Vektor (EV) pQE70 als Negativkontrolle wurden heterolog exprimiert, isoliert und aufgereinigt wie in II.4.1.14 bis II.4.1.16 und II.4.1.18 beschrieben. Zur Kontrolle wurden die rekombinanten Proteine über ein SDS-Polyacrylamidgel (II.4.1.19) aufgetrennt und mittels Western Blot (II.4.1.26) mit dem monoklonalen Anti-6× His AP Konjugat Antikörper (II.1.13) visualisiert.

4.1.27.c Untersuchungsmaterial: phenolischer Extrakt der Erdbeergenotypen

Bei der Suche nach hypoallergenen Erdbeergenotypen für den anschließenden Basophilen Aktivierungstest wurden verschiedene Genotypen der Gattung *Fragaria* und den Arten *vesca*, *ananassa* und *nilgerrensis*, aufgelistet in Tabelle 1, analysiert. Die Erdbeerfrüchte wurden geerntet und bis zur Proteinextraktion bei -20°C gelagert. Die Proteine wurden aus den reifen Erdbeerfrüchten von den verschiedenen weiß- und rot-fruchtigen *Fragaria*-Genotypen (Tabelle 1) mittels phenolischer Extraktion in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren wie in II.4.2.1 beschrieben extrahiert. Die Proteinkonzentration wurde wie in II.4.1.18 beschrieben ermittelt. Für die Suche nach hypoallergenen Erdbeergenotypen wurden die phenolisch extrahierten Proteine durch ein 12%-iges SDS-Polyacrylamid Trenngel (II.4.1.19) separiert und mittels der sensitiven Silberfärbung (II.4.1.22) auf dem Polyacrylamidgel visualisiert. Des Weiteren wurden die Proteine durch einen Western Blot vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran übertragen und die Fra a 1 homologen Proteine wurden unter Verwendung des primären polyklonalen Anti-Fra a 1.02 Antikörpers und dem darauffolgenden sekundären monoklonalen Anti-rabbit (Fc) AP Konjugat Antikörper (II.1.13; II.4.1.25) visualisiert.

Durch das Screening nach hypoallergenen Erdbeergenotypen wurden die im Folgenden aufgelisteten Genotypen für den Basophilen Aktivierungstest, basierend auf der mittels Western Blot der phenolischen Extrakte sichtbaren Anwesenheit vom Erdbeerallergen Fra a 1, ausgewählt. Als Positivkontrollen wurden die Genotypen rot-fruchtiger Wildtyp der Walderdbeere *F. vesca* (WT; unbeschriebene Sorte), *F. ×ananassa* cv. Elsanta und *F. ×ananassa* cv. Mara des Bois eingesetzt. Bezüglich ihrer hypoallergenen Eigenschaften wurden die Genotypen *F. vesca* `Hawaii 4`, *F. vesca* cv. Yellow Wonder, *F. vesca* `185`, *F. nilgerrensis* `Dickore 1`, *F. nilgerrensis* `Dickore 2`, *F. nilgerrensis* `Mt. Omei 1`, *F. nilgerrensis* `Mt. Omei 2`, *F. nilgerrensis* `Yunnan 3`, *F. nilgerrensis* `St. 94/04-1`, *F. nilgerrensis* `St. 98/2-1`, *F. nilgerrensis* `Leigong 2` und *F. × ananassa* `P-100693` (freundlicherweise bereitgestellt von Hansabred) während des Basophilen Aktivierungstestes untersucht (Tabelle 1).

4.1.27.d Basophilen Aktivierungstest

Zur quantitativen Bestimmung der Basophilenaktivierung von humanen basophilen Granulozyten mittels Durchflusszytometrie, induziert durch rBet v 1a, rFra a 1.01E-1.08, den leeren Vektor pQE70 (EV) und drei rot-fruchtigen und zwölf natürlich vorkommenden weiß-fruchtigen Erdbeergenotypen (II.4.1.27.b), wurde ein kommerziell erhältliches Kit FlowCAST® (II.1.11) verwendet und wie beschrieben durchgeführt (Eberlein, Suarez et al. 2010). Von allen Probanden wurden Vollblutproben in 10 ml K-EDTA Venenpunktionsröhrchen gesammelt und bei 22°C auf einem Vortex-Mischer ständig bewegt. Die Tests wurden innerhalb von 24 h nach der Blutentnahme durchgeführt. Die rekombinanten Proteine wurden mit bidest. Wasser auf eine Stammkonzentration von 100 µg/ml

eingestellt und auf vier verschiedene Konzentrationen (500 ng/ml, 50 ng/ml, 5 ng/ml und 0,5 ng/ml) verdünnt im BAT eingesetzt. Die phenolischen Proteinextrakte der Erdbeeren wurden ebenfalls mit bidest. Wasser auf eine Stammkonzentration von 100 µg/ml eingestellt und auf fünf verschiedene Konzentrationen (1000 ng/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml und 62,5 ng/ml) verdünnt verwendet. Eine Negativkontrolle ohne Allergen, pQE70 EV und beide Positivkontrollen des Kits FlowCAST® (Anti-FcεRI und fMPLP; II.1.11), wurden wie die Proben mit Allergen behandelt. Die Analyse wurde innerhalb von 2 h unter Verwendung eines FACScan-Durchflusszytometers (II.3.1) und der CellQuest™ Software (II.2) durchgeführt. Für jede Probe wurden ca. 500 Zellen untersucht. Ergebnisse mit >15% wurden als positiv angesehen (Schober, Belloni et al. 2006, Eberlein, Krischan et al. 2012, Franz-Oberdorf, Eberlein et al. 2016). Der Basophilen Aktivierungstest mit rekombinanten Proteinen und mit dem phenolischen Extrakt der Erdbeergenotypen wurde in drei biologischen Replikaten durchgeführt.

4.1.28 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Eine differentielle Genexpressionsanalyse wurde mittels einer quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Die cDNA (II.4.1.1; II.4.1.2; II.4.1.3) von verschiedenen Erdbeerarten und Genotypen (II.1.1.1) und Gen-spezifische Primer (II.1.8.4) wurden eingesetzt, um die spezifische Genexpression nachweisen zu können. Das SensiMix™ SYBR Hi-Rox-Kit (II.1.11) wurde zu diesem Zweck eingesetzt. Der inerte Farbstoff ROX ändert als passive Referenz seine Fluoreszenz während der PCR-Reaktion nicht. Die qRT-PCR Analyse, einschließlich ROX, führt zu einem präziseren Ergebnis durch die Normalisierung der Fluoreszenzfluktuationen, die durch Pipettierfehler oder Geräteeinschränkungen verursacht werden.

Die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion wurde auf einer 96-Well-Reaktionsplatte (II.3.2) mit dem Real-Time PCR-System StepOnePlus™ (II.3.1) durchgeführt. Das SensiMix™ SYBR Hi-Rox-Kit wurde eingesetzt, um doppelsträngige cDNA zu detektieren. Gen-spezifische Primer für die Amplifikation der Zielgene und des Interspacer-Haushaltsgens 16S-23S-RNA (interne Kontrolle; FaRIB413) wurden zur Normalisierung der Expressionswerte designt. Die qRT-PCR Reaktion wurde wie in Tabelle 22 beschrieben angesetzt.

Tabelle 22 Ansatz für eine quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Komponenten	Zielgene	Interspacer-Haushaltsgen
2 × SensiMix™ SYBR Hi-Rox	10 µl	10 µl
<i>forward</i> -Primer	0,6 µl (10 µM Stammlösung)	0,6 µl (10 µM Stammlösung)
<i>reverse</i> -Primer	0,6 µl (10 µM Stammlösung)	0,6 µl (10 µM Stammlösung)
cDNA	2 µl einer 100-fachen Verdünnung	2 µl einer 8.000-fachen Verdünnung
DEPC-Wasser	6,8 µl (20 µl Reaktionsvolumen)	6,8 µl (20 µl Reaktionsvolumen)

Die quantitative Real-Time PCR mit drei technischen Replikaten und einer Negativkontrolle (DEPC-Wasser anstelle von cDNA) wurde mit dem in Tabelle 23 aufgeführten Temperaturzyklusprogramm durchgeführt. Die Schmelztemperatur (T_m), die Schmelztemperaturkurve und die Elongationszeit wurden jeweils an die verwendeten Primer und die Länge des spezifischen DNA-Fragmentes angepasst.

Tabelle 23 Allgemeines Temperaturzyklusprogramm für eine quantitative Real-Time PCR

qRT-PCR Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklus
Halteschritt	95°C	10 min	1
PCR-Zyklus Schritt	95°C	15 sec	

	60°C	15 sec	40
	72°C	15 sec	
Schmelzkurve	95°C	15 sec	
	60°C	1 min (+ 0.3°C/15 sec Schritte)	1
	95°C	15 sec	

Eine Standard-Anstiegsgeschwindigkeit wurde ausgewählt und die Temperaturerhöhung für die Schmelzkurve betrug 0,3°C pro 15 sec.

Die relative Genexpression von Ziel- und Interspacer-Haushaltsgenen wurde unter Verwendung der in der StepOne™ Software und Microsoft Excel (II.2) enthaltenen $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak and Schmittgen 2001) quantifiziert. Die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode gibt die x-fache Änderung jeder Probe bezogen auf die angegebene Referenzprobe an. Der Schwellenzykluswert (C_T) ist die Anzahl von Zyklen, die erforderlich sind, um eine definierte Fluoreszenzintensitätsschwelle zu erreichen. Die Berechnung der relativen Genexpression wurde unter Verwendung der folgenden Gleichungen durchgeführt.

1. $\Delta C_T = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{interne Kontrolle})$
2. $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{Zielgen}) - \Delta C_T(\text{Referenz})$
3. $\text{relative Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$

Der ΔC_T -Wert wurde durch Subtraktion des Zielgen- C_T -Wertes und des C_T -Wertes des internen Kontrollgens (Gleichung 1) erreicht. Gleichung 2 zeigt die Differenz zwischen dem ΔC_T -Zielgen und einem spezifizierten ΔC_T -Referenzgen (z.B. *F. vesca* rot-fruchtiger Wildtyp). Schließlich führt Gleichung 3 zu den Werten der relativen Genexpression, die mit der R-Software (II.2) in einem Boxplot aufbereitet dargestellt wurden.

Als Matrizen-DNA für die quantitative Real-Time PCR Analyse wurden die cDNAs von vier verschiedenen Erdbeergenotypen (*F. vesca* rot-fruchtiger Wildtyp, *F. vesca* cv. Yellow Wonder, *F. xananassa* cv. Elsanta und cv. Mara des Bois) verwendet sowie spezifisch entwickelte Primer für den Nachweis der differentiellen Genexpression der Gene *Fra a 1.01E/1.02/1.03* und des Interspacer-Haushaltsgenes (*FaRIB413*; II.1.8.4; (Amil-Ruiz, Garrido-Gala et al. 2013)).

4.1.29 Analyse der Protein-Protein-Wechselwirkungen

4.1.29.a Hefe Zwei-Hybrid (Y2H)

Das MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 (II.1.11) wurde verwendet, um Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* zu identifizieren. Die entsprechenden ORF-Sequenzen der drei putativen Erdbeerallergen-Isoformen *Fra a 1.01E/1.02/1.03* und des putativen Interaktionspartners *FaAP* wurden in den "Köder"-Vektor (bait) pGBKT7 (GAL4-DNA-Bindedomäne (GBD)) sowie in den "Beute"-Vektor (prey) pGADT7 (GAL4-Aktivierungsdomäne (GAD)) kloniert (II.1.6). Die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen *Mal d 1* (II.1.2; cDNA von dem Kultivar 'Golden Delicious') und *MdAP* (II.1.2; cDNA von dem Kultivar 'Golden Delicious') wurde wiederholt, um die Ergebnisse von Puehringer und Kollegen zu bestätigen und zu verifizieren (Puehringer, Zinoecker et al. 2003). Beide Interaktionspartner vom Apfel wurden ebenfalls in die Vektoren pGBKT7 sowie pGADT7 kloniert. Der *Saccharomyces cerevisiae* Stamm Y190 (II.1.6) trägt einen Auxotrophiemarker (*His3-*) und zwei enzymatische Reportergene (*lacZ* und *Mel1*), die von verschiedenen GAL4-responsiven Promotoren angetrieben werden. Die Herstellung kompetenter Hefezellen des *S. cerevisiae* Stammes Y190 und die Transformation von Y190 Hefezellen mit den entsprechenden "Köder"- und "Beute"-Vektoren erfolgte unter Verwendung des *S. c.* EasyComp™-Transformationskits (II.1.11) und wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt (II.4.1.10). Transformierte Hefezellen des Stammes Y190 wurden auf

Minimalmedium, welchem Tryptophan (W) und Leucin (L) fehlten, ausplattiert (II.1.10.1) und für 2 Tage bei 30°C inkubiert, um zu testen, ob die Hefezellen erfolgreich mit den beiden "Köder"- und "Beute"-Vektoren transformiert wurden. Um die Y2H-Wechselwirkung beider exprimierter Proteine in den Hefezellen zu untersuchen, wurden die transformierten Hefezellen für 4 Tage bei 30°C auf einem Minimalmedium, welchem Tryptophan (W), Leucin (L) und Histidin (H) fehlten, inkubiert. Zusätzlich enthielt dieses Medium 2,5 bis 5 mM (max. 20 mM) 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT; II.1.10.1; II.1.4), um das Hintergrundwachstum (Autoaktivität) zu unterdrücken. Als Negativkontrollen wurden die leeren "Köder"- und "Beute"-Vektoren mit jedem möglichen Interaktionspartner und auch miteinander ko-transformiert. Als Positivkontrolle wurden AMSH3 (AXA) ("Beute") und VPS2.1 ("Köder") nach Katsiarimpa und Kollegen ebenfalls mitgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels Fotografie dokumentiert (Katsiarimpa, Anzenberger et al. 2011).

4.1.29.b „Time-resolved DNA switching“ Analyse

Eine weitere und neue Analysenmethode zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist die „time-resolved DNA switching“ Messung, bei welcher die Funktionalität von kurzen bewegbaren DNA-Fragmenten (Layer) unter Verwendung des kommerziellen Amine Coupling Kits 1 (MW >1 kDa) (II.1.11) gemäß den Anweisungen des Herstellers eingesetzt wird. Protein-DNA-Konjugate von 48-x DNA-Layern mit den möglichen Interaktionspartnern Fra a 1.01E, Fra a 1.02, Fra a 1.03, FaAP-eGFP und eGFP wurden synthetisiert. Der jeweilige mögliche Interaktionspartner wurde mit einem Puffer über den Sensor mit den 48-x DNA-Layer gekoppelten Proteinen gespült. Die Geschwindigkeit der Bewegung der DNA-Layer bei wechselnder angelegter Spannung wurde gemessen. Die Analysen wurden mit dem von Dynamic Biosensors entwickelten Analysegerät DRX 2400 (II.3.1) durchgeführt.

4.1.29.b.1 Biochip- und DNA-Layer Vorbereitung

Die Experimente wurden mit beweglichen und „schaltbaren“ DNA-Layer auf einem Biochip, je nach angelegter Spannung an den Biochip, durchgeführt. Thiolierte 48-x Oligonukleotide (II.3.2) wurden an Gold-Elektroden (120 µm Durchmesser) auf einer Glasplatte mittels Spotting mit einem Pikoliter-Dispensersystem aufgebracht. Nach einer 10-minütigen Inkubation unter gleichzeitiger Adsorption von Mercaptohexanol zur Passivierung der Oberfläche wurde der Biochip zusammengesetzt, indem Fließkanäle unter Verwendung eines Doppelklebefilms als Zwischenschicht und ein ITO (Indium-Zinn-Oxid) -Deckglas als Deckschicht und Gegenelektrode den Biochip vervollständigen. Doppelsträngige DNA-Layer wurden durch Spülen mit einer NaOH-Lösung (pH 12-13) über die Elektroden für 1 sec denaturiert. Anschließend können die DNA-Layer durch Hybridisierung mit frischer komplementärer DNA regeneriert werden (Langer, Hampel et al. 2013).

4.1.29.b.2 Modifikation von 48-x DNA-Layer mit Proteinen

NTA₃-markierte 48-x DNA-Layer wurden aus triaminierter DNA (II.3.2) synthetisiert (Goodman, Erben et al. 2009, Knezevic, Langer et al. 2012). Die NTA₃-Chelatorköpfe wurden während einer 10-minütigen Inkubation in 500 µM NiCl₂ Lösung beladen und anschließend wurden die überschüssigen zweiwertigen Ionen mit 5 mM EDTA chelatiert und durch das Spülen der Biochip-Oberfläche mit T-Puffer (II.1.10.2) entfernt. Protein-DNA-Konjugate von 48-x DNA-Layern mit rFra a 1.01E, rFra a 1.02 und rFra a 1.03 (500 nM rFra a 1 Proteine) wurden unter Verwendung eines SMCC-Linkers (Succinimidyl-4-[N-maleimido-methyl]cyclohexan-1-carboxylat) synthetisiert (Langer, Hampel et al. 2013). Eine weitere Bildung eines Protein-DNA-Konjugates ist die Bindung des möglichen Interaktionspartners an die NTA₃-markierte 48-x DNA unter Verwendung des His-tags an den rekombinanten Proteinen Fra a 1.01E, Fra a 1.02, Fra a 1.03, FaAP-eGFP und eGFP (Goodman, Erben et al. 2009, Knezevic, Langer et al. 2012).

4.1.29.b.3 Messung der Protein-Protein-Wechselwirkung: Positivkontrolle

Das rekombinante Protein ABI2 (50 nM) mit einem His-tag wurde an NTA₃-markierte 48-x DNA-Layer in T-Puffer gebunden. Die Wechselwirkung zwischen ABI2 mit RCAR8 und Abscisinsäure wurde durch anschließende Überspülung des auf dem Biochip immobilisierten ABI2 Proteins mit 100 nM RCAR8 mit

und ohne 10 μM Abscisinsäure in wechselnder Reihenfolge untersucht. Als negative Kontrolle wurden alle Experimente mit unmodifizierter 48-x DNA wiederholt.

4.1.29.b.4 Messung der Protein-Protein-Wechselwirkung

Die jeweiligen rekombinanten Proteine (Fra a 1.01E-1.03, FaAP-eGFP, eGFP) wurden in His-tag Elutionspuffer (II.1.10.2) gelöst, welcher über Zeba™ Entsalzungssäulen (II.3.2) gegen T-Puffer (II.1.10.2) ausgetauscht wurde. Die Proteine FaAP-eGFP, eGFP und der polyklonale Antikörper gegen Fra a 1.02 wurden über die 48-x DNA-Layer mit den DNA-Fra a 1.01E, -Fra a 1.02 und -Fra a 1.03-Konjugaten durch Überspülen einer Lösung aus 200 nM, 500 nM oder 2 μM FaAP-eGFP und eGFP bzw. 50 nM Fra a 1.02-Antikörper in T-Puffer über den Sensor gegeben. Die Wechselwirkung mit den an den 48-x DNA-Layern gebundenen Proteinen wurde untersucht. Es wurde abgewartet bis die Dynamic Response die Sättigung anzeigte (900 sec). Da die Fra a 1-DNA-Konjugate nicht gereinigt wurden, liegt immer eine Mischung aus unmodifizierter und modifizierter DNA auf der Oberfläche des Biochips vor. Dissoziationen von Proteinen wurden durch einen Spülvorgang mit Spülpuffer (Puffer b; II.1.10.2) gemessen (1200 sec). Die Untersuchung der Interaktion wurde sowohl unter Verwendung der mit einem His-tag markierten Proteine Fra a 1.01E, Fra a 1.02, Fra a 1.03, FaAP-eGFP und eGFP, die an NTA₃-markierte 48-x DNA-Layer gebunden wurden, als auch über die Kopplung der Proteine an 48-x DNA über Amine in Puffer c (II.1.10.2) durchgeführt. Eine vollständige Benetzung der Oberfläche wurde durch die Verwendung einer Proteinkonzentration von mindestens 200 nM während aller Experimente sichergestellt. Als Negativkontrolle wurden alle Experimente mit unmodifizierter 48-x DNA wiederholt. Für die Proteingrößenmessung mit dem Lollipop-Modell wurden zeitaufgelöste ansteigende Kurven vor und nach der Sättigung von NTA₃-DNA-Layer mit His-tag markiertem Protein verwendet (Langer, Hampel et al. 2013). Zuerst wurde die zeitaufgelöste Kurve der nackten DNA ermittelt. Anschließend wurden die erhaltenen Parameter verwendet, um den hydrodynamischen Durchmesser des gebundenen Proteins zu berechnen.

4.2 Methoden mit pflanzlichem Material

4.2.1 Phenolischer Proteinextrakt aus Erdbeerfrüchten

Zehn g gefrorene Erdbeerfrüchte wurden in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemahlen und sorgfältig mit 15 ml eiskalten Proteinextraktionspuffer, der für die Gattung *Fragaria* verwendet wird, gevortext (II.1.10.2). Die Mischung wurde 30 min auf Eis inkubiert und alle 5 min kurz gevortext. Fünfzehn ml Phenol (II.1.4) wurden hinzugegeben, gevortext, 30 min auf Eis inkubiert und erneut alle 5 min kurz gevortext. Nach einem Zentrifugationsschritt (20 min, 13.500 rpm, 4°C) wurde die obere Phenolphase in ein neues 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen an Proteinextraktionspuffer gemischt, der für die Gattung *Fragaria* verwendet wird. Die Mischung wurde sorgfältig gevortext, 15 min auf Eis inkubiert und alle 5 min kurz gevortext. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (20 min, 13.500 rpm, 4°C) wurde der vorher beschriebene Schritt einmal wiederholt. Die finale obere Phenolphase wurde in ein neues 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt und mit dem 5-fachen Volumen gesättigtem Ammoniumacetat in Methanol (II.1.10.3) versetzt. Die Proteine wurden über Nacht bei -20°C präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation (30 min, 13.500 rpm, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 6 ml Methanol (-20°C) und zweimal mit 6 ml Aceton (-20°C) gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt (5 min, 13.500 rpm, 4°C) wurde das Pellet an der Luft getrocknet. Die extrahierten Proteine wurden in 500 μl 0,1 M TRIS/HCl-Puffer (pH 7,5; II.1.10.2) gelöst, die Proteinkonzentration (II.4.1.18) gemessen, direkt analysiert oder bei 4°C bis zur Analyse gelagert.

4.2.2 Immuno-Tissue-Print (ITP)

Nach dem Schneiden von Erdbeerfrüchten wird viel Flüssigkeit freigesetzt, welche zunächst mit einem Filterpapier aufgesogen wird, um die Flüssigkeit vor dem Drucken der Schnittfläche auf der, wie bei der Western Blot Analyse (II.4.1.26), vorbehandelten PVDF-Membran zu entfernen. Die übertragenen Fra a 1 Isoformen auf der PVDF-Membran wurden unter Verwendung des polyklonalen Anti-Fra a 1.02 Antikörpers und des sekundären monoklonalen Anti-rabbit Antikörpers, konjugiert mit AP, wie bei der

Western Blot Analyse visualisiert (Marzban, Puehringer et al. 2005). Das Ergebnis wird mittels Scanner dokumentiert.

4.3 Statistische Analyse und Boxplots

Der Two-sample-Wilcoxon-Test wurde unter Verwendung der Software R (II.2) berechnet. Für die Berechnung eines ungepaarten t-Tests, der Mittelwerte und der Standardabweichungen wurde die Software Excel (II.2) angewendet. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Daten wurden als arithmetische Mittel \pm SD ausgedrückt. Boxplots wurden mit der Software R (II.2) erstellt.

Statistische Signifikanzniveaus zwischen den Variablengruppen, wie den Allergenen, Subjektgruppen und der Kontrollgruppe wurden unter Verwendung einer Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) berechnet.

III Ergebnisse

1. Auswahl der Fra a 1 Isoformen

1.1 Einordnung der 21 Fra a 1 Isoformen in die PR-10 Proteinfamilie

Die Bet v 1-Superfamilie (Gough, Karplus et al. 2001, Wilson, Pethica et al. 2008) wurde unter Verwendung verschiedener Algorithmen bezüglich der taxonomischen Einordnung, Kombination der Domänen, Sequenzalignments, Genomzuordnungen und strukturellen Klassifikationen der beteiligten Proteinsequenzen erstellt. Diese wichtige und weitverbreitete Superfamilie mit Vertretern in Eukaryoten, Bakterien und Archaea beherbergt zahlreiche orthologe Proteine, die sich in ihren Tertiärstrukturen, Strukturdomänen, chemischen Eigenschaften, Funktionen und weiteren

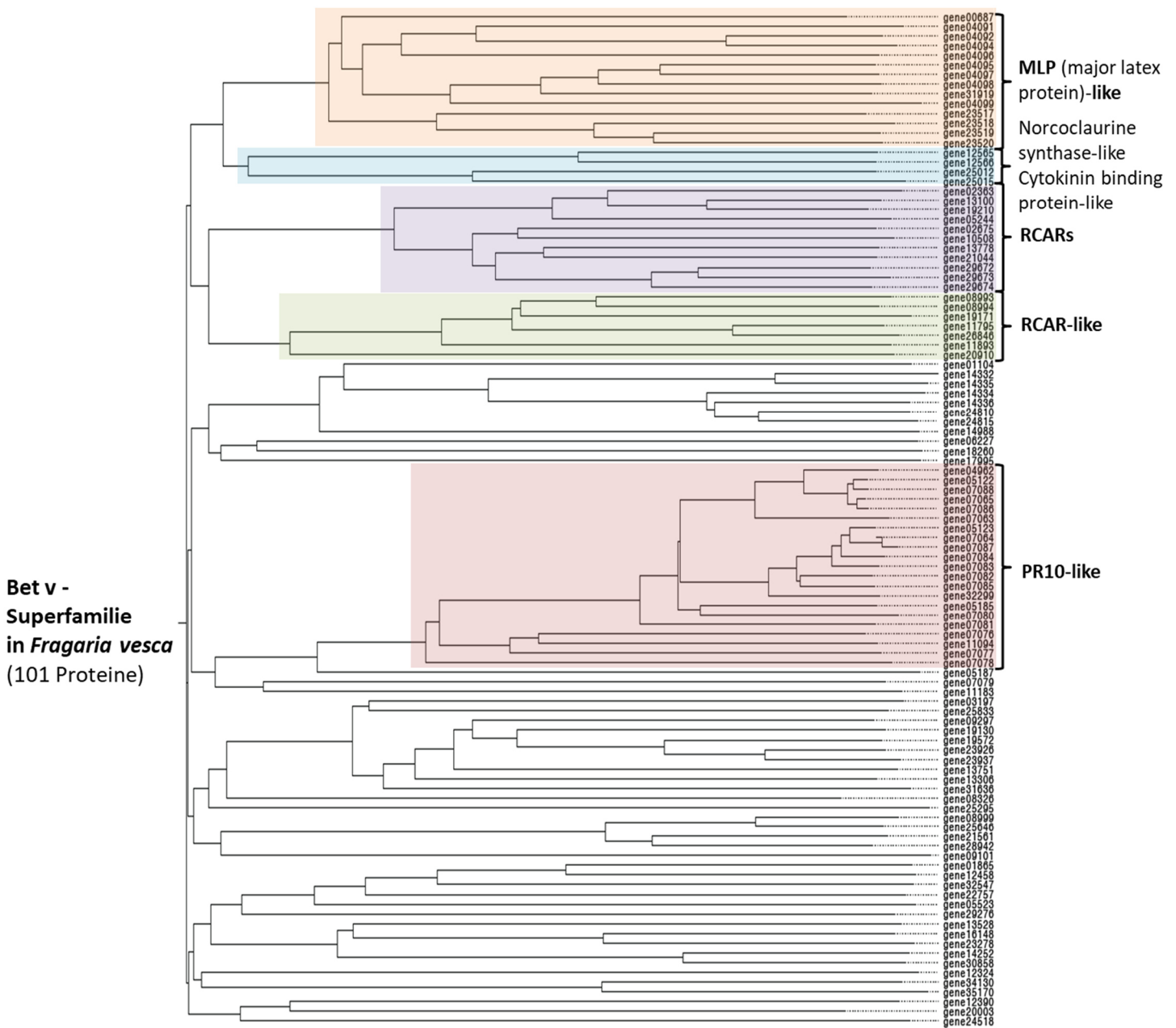


Abbildung 17 Proteinsequenzanalyse von 101 Proteinen der Bet v 1-Superfamilie im Genom von *Fragaria vesca* mit den hervorgehobenen Proteinfamilien MLP (major latex protein) -like, Norcochlorine synthase-like/Cytokinin binding protein-like, RCARs (Regulatory Component of ABA-Receptor), RCAR-like und PR10 (Pathogenesis-related protein 10) -like.

Parametern ähneln. Bekannte Orthologe und bereits im Fokus der Forschung befindliche Mitglieder der Bet v 1-Superfamilie sind z.B. das Haupt-Apfelallergen Mal d 1, das Haupt-Kirschenallergen Pru av 1 und das Haupt-Aprikosenallergen Pru ar 1. Im Jahr 2010 wurde das Genom von *Fragaria vesca*, der Walderdbeere, vollständig sequenziert (Shulaev, Sargent et al. 2011). Im Genom der Walderdbeere wurden Gene identifiziert, welche für 101 Proteine kodieren, die zur Bet v 1-Superfamilie zählen (Abbildung 17).

Der Großteil der 101 Proteine kann in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden, wie die Haupt-Latex-Protein-homologe (14 Mitglieder), Norcoclaurin-Synthase-homologe und Cytokinin-bindende-homologe (vier Mitglieder), RCAR- (Regulatory Component of ABA-Receptor; elf Mitglieder), RCAR-homologe (sieben Mitglieder) und die PR-10 homologe Proteinfamilie (Pathogenesis-related protein 10; 21 Mitglieder). Eine der wichtigsten und größten Proteinfamilie in der Bet v 1-Superfamilie mit wichtigen Funktionen wie zum Beispiel in der systemischen erworbenen Resistenz ist die PR-10-homologe Familie (Murzin, Brenner et al. 1995, Van Loon, Rep et al. 2006); I.2.2). Ein Alignment des Bet v 1 Proteins, den bekannten Aminosäuren-Sequenzen der Fra a 1 Erdbeerallergene (Fra a 1.01E, Fra a 1.02, Fra a 1.03; Abbildung 11) (Karlsson, Alm et al. 2004, Hjernø, Alm et al. 2006) und Proteinsequenzen, die vom *Fragaria vesca* 'Hawaii 4' Genom kodiert werden führte zur Identifizierung von 21 PR-10-homologen Proteinen als mögliche Fra v 1 Erdbeerallergene und weiteren orthologen Proteinen von Bet v 1.

1.2 Auswahl der Fra a 1 Proteine

Das Genom von *F. vesca* enthält 15-46 Gene, die den Selektionskriterien nach der Unterfamilie PR-10 der Bet v 1-Superfamilie entsprechen (Hoffmann-Sommergruber 2002, Hyun and Kim 2011). Die 21 Sequenzen, welche mittels Alignment identifiziert wurden und den Proteinen Fra 1.01E/1.02/1.03 sehr ähnlich sind, wurden für phylogenetische Analysen ausgewählt (Abbildung 11, Tabelle 24). Da sich die allergischen Symptome nach dem Verzehr der reifen Erdbeerfrüchte bei Patienten, welche unter einer Allergie leiden, durch OAS und *rhinoconjunctivitis allergica* (I.2) äußert wurde angenommen, dass die Hauptallergene in der reifen Erdbeerfrucht besonders stark exprimiert werden. Es wurden deshalb die 21 identifizierten Gene zunächst hinsichtlich ihrer relativen Genexpression in den reifen Früchten untersucht. Neben den drei Isoformen Fra a 1.01E, Fra a 1.02 und Fra a1.03, deren Expression bereits in der Frucht gezeigt wurde (Muñoz, Hoffmann et al. 2010) konnten weitere fünf Isoformen durch Frau Dr. Fatma Besbes an der Professur für Biotechnologie der Naturstoffe in der Erdbeerfrucht identifiziert werden (Besbes et al. 2019). Fra a 1.01E war das erste identifizierte und rekombinant exprimierte Erdbeerallergen und wurde als Haupt-Erdbeerallergen bezeichnet (Karlsson, Alm et al. 2004) (I.2.4.2).

Tabelle 24 Fra a 1 Nomenklatur in *Fragaria xananassa* und *Fragaria vesca* (Hyun and Kim 2011; Shulaev et al. 2011).

Genname <i>Fragaria xananassa</i>	Gen ID (Shulaev et al. 2011; fvesca v.1.1_genemark hybrid version)	Genname <i>Fragaria vesca</i> (Hyun and Kim, 2011)	GenBank Akzessionsnr.	ORF (nt)	Länge (aa)	pI/MW (kDa)	Proteinsequenz paarweise-Ähnlichkeit (%; bezogen auf Fra a 1.02)	Proteinsequenz paarweise-Ähnlichkeit (%; bezogen auf Bet v 1)
<i>Fra a 1.02</i>	gene07086	<i>Fra v 1.05A</i>	GQ148818	483	161	5,1/17,6	Referenz	58,4
<i>Fra a 1.01E</i>	gene07080	<i>Fra v 1.10</i>	AM236319	483	161	6,6/17,8	78,9	54
<i>Fra a 1.03</i>	gene07082	<i>Fra v 1.08</i>	GQ148819	480	160	5,6/17,5	80,1	59
<i>Fra a 1.04</i>	gene05122	<i>Fra v 1.06B</i>	KJ507735	483	161	4,9/17,5	95,7	58,4
<i>Fra a 1.05</i>	gene07065	<i>Fra v 1.05B</i>	KJ507736	483	161	5,0/17,5	97,5	59
<i>Fra a 1.06</i>	gene07088	<i>Fra v 1.06A</i>	KJ507737	483	161	4,9/17,5	96,3	57,8
<i>Fra a 1.07</i>	gene05123	<i>Fra v 1.01</i>	KJ507738	483	161	5,6/17,6	74,5	59,6
<i>Fra a 1.08</i>	gene07064	<i>Fra v 1.02</i>	KJ507739	483	161	5,9/17,5	77,0	59

Die Erdbeerallergene Fra a 1.02 und Fra a 1.03 wurden mittels Erdbeer-EST's und basierend auf deren hoher Homologie zu Fra a 1.01a-e identifiziert (Muñoz, Hoffmann et al. 2010).

Die fünf weiteren Fra a 1 Homologen wurden basierend auf der Nomenklatur Fra a 1.04 bis Fra a 1.08 genannt. Die acht in der Erdbeerfrucht (*F. xananassa*) exprimierten Proteine wurden rekombinant in *E. coli* produziert und für weitere Analysen ausgewählt (siehe Anhang V.2, Abbildung 38) (Gough, Karplus et al. 2001, Muñoz, Hoffmann et al. 2010, Darwish, Slovin et al. 2013, Kang, Darwish et al. 2013, Besbes, Franz-Oberdorf et al. 2019).

1.3 *In silico* Analyse der acht Fra a 1 Proteinsequenzen

Ein Proteinsequenzalignment der 21 Fra v 1 Sequenzen mit den acht identifizierten Fra a 1 Aminosäure-Sequenzen zeigte die offensichtliche Verwandtschaft und den hohen Grad an Homologie zwischen den beiden Erdbeerarten *F. vesca* und *F. xananassa*. Sechs der ausgewählten und aus dem Genom von *F. xananassa* cv. Elsanta stammenden rekombinant hergestellten Proteinen sind identisch mit denen aus dem Genom von *F. vesca*, während Fra a 1.01E und Fra a 1.02 einen bzw. drei Aminosäureaustausche im Vergleich zu ihren orthologen Proteinen aus *F. vesca* aufweisen (Abbildung 11). Sieben der acht Fra a 1 Isoformen setzen sich aus 483 nt zusammen und weisen somit 161 Aminosäuren auf. Fra a 1.03 bildet die Ausnahme mit 480 nt und folglich 160 Aminosäuren. Die acht Fra a 1 Proteinsequenzen, isoliert aus *F. xananassa* cv. Elsanta, weisen 99 identische Nukleotide von insgesamt 160-161 Aminosäuren (61,5%) und eine paarweise Nukleotidähnlichkeit von 73,3% auf. (Abbildung 11) (Gough, Karplus et al. 2001). Das Molekulargewicht der Fra a 1 Isoformen liegt zwischen 17,5 und 17,8 kDa und der isoelektrische Punkt variiert in einer Bandbreite von 4,9 für Fra a 1.04/1.06 und 6,6 für Fra a 1.01E. Ein Proteinsequenzalignment hebt die paarweise Identität von Fra a 1.05, Fra a 1.06 und Fra a 1.04 bezogen auf die Sequenz von Fra a 1.02 mit jeweils 97,5%, 96,3% bzw. 95,7% hervor, gefolgt von Fra a 1.03 (80,1%), Fra a 1.01 E (78,9%), Fra 1.08 (77%) und Fra a 1.07 (74,5%). Die paarweise Identität der Proteinsequenzen der acht Fra a 1 Isoformen bezogen auf die Proteinsequenz von Bet v 1 liegt im Bereich von 59,6% für Fra a 1.07 bis 54% für Fra a 1.01E. Der hohe Grad an Homologie zwischen den Fra a 1 Isoformen, Bet v 1 und weiteren orthologen Proteinen von Bet v 1 wie Mal d 1, Pru av 1 und Pru ar 1 ist in dem Proteinsequenzalignment sichtbar (Abbildung 11). Dieser hohe Grad an Homologie ist wohl auch in dem Verwandtschaftsgrad der orthologen Proteine zu suchen. Ein deutliches und ausgeprägtes Merkmal der Proteinsequenzen von Fra a 1, Bet v 1, Mal d 1, Pru av 1 und Pru ar 1 ist das Motiv eines möglichen Phosphat-Bindungs-Loops (P-Loop), welches sich von den Aminosäuren 47 bis 55 erstreckt und das Sequenzmuster [GXGGXGTXK] aufweist (Saraste, Sibbald et al. 1990, Muñoz, Hoffmann et al. 2010). Das spezifische Motiv des P-Loops für die acht Fra a 1 Isoformen lautet [GDGGXGTIK]. Es unterscheidet sich nur in der Aminosäure-Position 51, markiert mit einem X. Die Sequenz von Fra a 1.01E kodiert an dieser Position für ein Prolin im Gegensatz zu Fra a 1.02 bis 1.08, die an dieser Stelle ein Valin aufweisen (Abbildung 11).

2. Basophilen Aktivierungstest

2.1 Klinische und biologische Charakterisierung der atopischen und nicht-atopischen Probanden

Ziel des Basophilen Aktivierungstest war es das Fra a 1 Protein zu identifizieren, welches hauptsächlich für die allergische Reaktion verantwortlich ist. Das Selektionskriterium für die Probanden dieser Studie war deren Allergie gegen Birkenpollen und der damit verbundenen Kreuzallergie gegen Erdbeerfrüchte. Die acht atopischen Patienten mit Birkenpollenallergie zeigten *rhinoconjunctivitis allergica* gegen Birkenpollen und teilweise positive klinische Reaktionen (OAS) gegen Apfel, Tomate und andere verwandte, allergenhaltige Früchte und Gemüse (Tabelle 4, II.1.3). Die Anamnese von zwei Patienten wies eindeutig auf eine Allergie gegen Erdbeeren hin. Zwei von acht Patienten zeigten bei dem CAP-Test mit einem Erdbeerallergen-spezifischen Serum eine Konzentration von Erdbeerallergen-spezifischen IgE von 6,5 kU/L bzw. 0,5 kU/L, welche wiederum in die Klassen 3 bzw. 1 eingeteilt wurden. Die Ergebnisse des CAP-Tests mit Birkenpollen-spezifischen Serum wiesen eine Konzentration von Birkenpollen-spezifischen IgE in dem Bereich zwischen >100 kU/L und 10,8 kU/L auf. Diese Werte entsprechen den Klassen 3 bis 6. Keiner der atopischen Testpersonen zeigte eine allergische Reaktion

bei dem Skin-Prick-Test (SPT) mit dem im Handel erhältlichen Erdbeerextrakt. Der SPT war negativ bei allen Patienten mit dem phenolischen Proteinextrakt von *F. vesca* rot-fruchtiger WT (Quaddeln ≤ 3 mm; Quaddeln/Flare Bereich: 0/0 – 2/5), positiv in vier Fällen mit dem phenolischen Proteinextrakt von *F. xananassa* cv. Mara des Bois (Quaddeln/Flare Bereich: 0/0 – 6/25) und positiv bei sechs Probanden mit dem phenolischen Proteinextrakt von *F. xananassa* cv. Elsanta (Quaddeln/Flare Bereich: 0/0 – 4/30). In der Kontrollgruppe der nicht-atopischen Probanden konnte kein allergenspezifisches IgE im CAP-Test, weder gegenüber dem Birkenpollen-spezifischen Serum noch gegenüber dem Erdbeerallergen-spezifischen Serum, nachgewiesen werden. Die beiden Kontrollprobanden zeigten auch keine Reaktion auf den SPT gegenüber dem kommerziell erhältlichen und phenolischen Erdbeerextrakten der verschiedenen Erdbeerarten und Sorten (Tabelle 5, II.1.3).

2.2 Validierung des Basophilen Aktivierungstests für rekombinante Proteine

Basophile Granulozyten von atopischen und nicht-atopischen Probanden wurden mittels Durchflusszytometrie eindeutig identifiziert, da sie getrennt von den anderen Blutzellen unter Verwendung des Selektionsmarkers Chemokinrezeptor 3 (CCR3) nachgewiesen wurden. CCR3 wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen den menschlichen CCR3, welcher mit Phycoerythrin markiert war (Anti-CCR3-PE) nachgewiesen und die Anzahl der markierten Zellen sind im linken oberen Quadranten, dem Kanal für Anti-CCR3-PE, durch ein Quadrat markiert, sichtbar (Abbildung 18). Aktivierte Basophile, die mit dem monoklonalen Antikörper gegen den menschlichen *cluster of differentiation 63* (CD63) konjugiert mit Fluorescein Isothiocyanate (Anti-CD63-FITC) markiert wurden, sind im oberen rechten Quadranten (Q2), dem Kanal für Anti-CD63-FITC erkennbar und wurden in einer Population von 500 Zellen durch das Durchflusszytometer gezählt (Abbildung 18) (Eberlein,

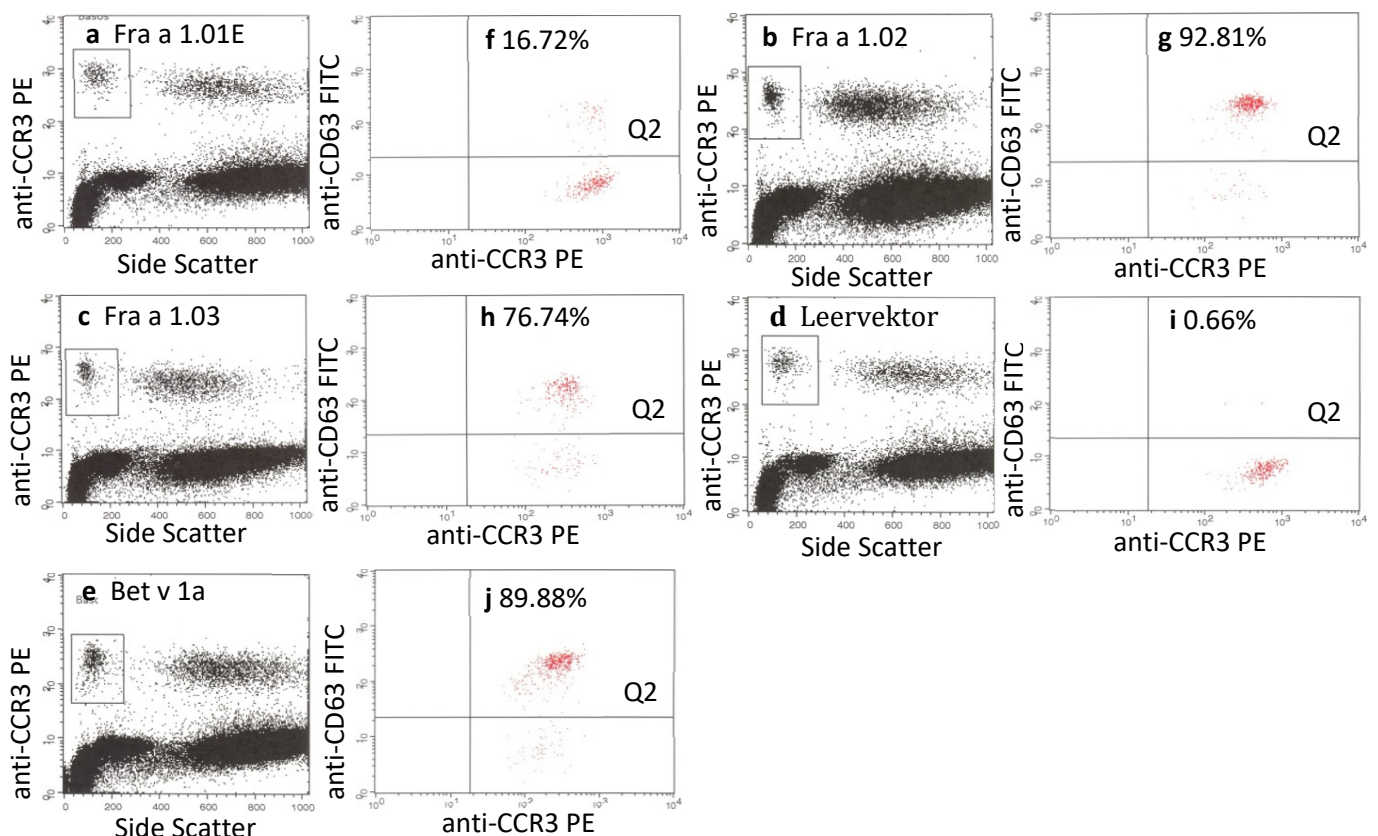


Abbildung 18 Durchflusszytometrische Analyse. Dot-Plot Beispiele des BAT unter Verwendung des CCR3-Selektionsmarkers mit Basophilen eines Birkenpollenallergikers nach Inkubation mit den mutmaßlichen Erdbeerallergenen Fra a 1.01E (a), Fra a 1.02 (b), Fra a 1.03 (c), der Negativkontrolle pQE70 EV (d) und der Positivkontrolle Bet v 1a (e) bei einer Konzentration von 50 ng/ml. Nachweis von aktivierten Basophilen durch CD63+ Expression auf Anti-CCR3-markierten Basophilen (f-j). Aktivierte basophile Granulozyten (f-j) werden als Prozentsatz von CD63+ positiven Zellen im oberen rechten Quadranten (Q2) ausgedrückt. Ein Ergebnis $\geq 15\%$ der CD63+ positiven Zellen wurde als positiv angesehen.

Suarez et al. 2010). Der Prozentsatz an CD63+ Zellen repräsentiert die Menge an aktivierten basophilen Granulozyten. Sie wurden in den Blutproben aller Probanden nach Stimulation mit den rekombinanten Proteinen Bet v 1a, Fra a 1.01E-1.08 (Tabelle 24), pQE70 EV und zwei Positiv- (anti-FcεRI, fMLP) und einer Negativkontrolle des Kits FlowCAST® quantifiziert. Bei den beiden im Kit FlowCAST® enthaltenen Positivkontrollen handelt es sich zum Einen um anti-FcεRI, einen hochspezifischen monoklonalen Antikörper, welcher mit hoher Affinität an den IgE-Binderezeptor bindet, und zum anderen um fMLP, einen unspezifischen Zellaktivator N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin.

Die rekombinanten Erdbeerallergene Fra a 1.01E-1.08 zeigten eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung nach Stimulierung der Basophilen mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 500 ng/ml mit der höchsten Basophilenaktivierung (siehe Anhang V.2, Abbildung 39). Die Positivkontrolle, rBet v 1a, erreichte bereits ein Maximum der Basophilenaktivierung bei 0,5 ng/ml, der niedrigsten eingesetzten Konzentration, und blieb auch bei höheren Konzentrationen auf einem hohen Niveau. Die Negativkontrolle pQE70 EV führte nach Stimulation mit den eingesetzten Konzentrationen zu keiner Basophilenaktivierung. In der Kontrollgruppe konnte keine Basophilenaktivierung durch rBet v 1a, rFra a 1.01E-1.08 und pQE70 EV gemessen werden (Tabelle 25). Die Inkubation von basophilen Granulozyten von Birkenpollenallergikern (n = 8) mit rBet v 1a, rFra a 1.01E-1.03 und rFra a 1.06-1.08 bei einer Konzentration von 50 ng/ml ergab einen beträchtlichen Anteil an CD63+ aktivierten Basophilen in einem Bereich von ca. 25% bis 73%. rFra a 1.04 und rFra a 1.05 führten hingegen in der atopischen Probandengruppe zu keiner Basophilenaktivierung. Die ermittelten Werte waren mit den Daten der Negativkontrolle pQE70 EV identisch (Tabelle 25).

Die basophilen Granulozyten der Kontrollgruppe (nicht-atopische Probanden) wurden weder durch Stimulierung mit rBet v 1a noch durch die der acht Fra a 1 Isoformen aktiviert (Tabelle 25).

Tabelle 25 CD63+ Basophilenaktivierung von atopischen (n = 8) und nicht-atopischen (n = 2) Probanden ermittelt mit den rekombinanten Protein-Stimuli rFra a 1.01E-rFra a 1.08, rBet v 1a, pQE70-Leervektor (EV; c = 50 ng/ml), zwei Positivkontrollen und einer Negativkontrolle (Blindwert).

Stimulus	CD63+ Mittelwert [%] atopische Gruppe	SD [%] atopische Gruppe	CD63+ Mittelwert [%] nicht-atopische Gruppe	SD [%] nicht-atopische Gruppe
Fra a 1.01E	24,91	0,30	0,0	0,0
Fra a 1.02	65,89	0,30	0,65	0,003
Fra a 1.03	72,59	0,21	0,55	0,002
Fra a 1.04	3,75	0,07	0,11	0,0008
Fra a 1.05	4,56	0,07	0,13	0,002
Fra a 1.06	36,93	0,29	0,0	0,0
Fra a 1.07	48,08	0,30	0,11	0,002
Fra a 1.08	25,71	0,27	0,20	0,003
pQE70 EV	3,12	0,05	0,48	0,001
Bet v 1a	46,59	0,17	0,21	0,003
FcεRI	79,56	0,19	82,82	0,13
fMLP	40,77	0,30	29,17	0,30
Negativkontrolle	0,11	0,002	0,31	0,004

Die Zuverlässigkeit der Methode wurde durch die Analyse von Kontrollproben nachgewiesen. Der Mittelwert der Prozentsätze an CD63+ aktivierten basophilen Granulozyten nach Inkubation von Vollblut der acht atopischen Probanden mit jeweils den beiden Positivkontrollen des Kits FlowCAST® anti-FcεRI und fMLP betrug 79,56% (± 0,19%) bzw. 40,77% (± 0,30%) verglichen mit den Durchschnittswerten der nicht-atopischen Kontrollgruppe 82,82% (± 0,13%) und 29,17% (± 0,30%). Diese Kontrollen wiesen somit keinen signifikanten Unterschied auf. Die Ergebnisse der beiden

Negativkontrollen, Waschpuffer des FlowCAST®-Kits und pQE70 EV unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant zwischen den beiden Probandengruppen (Tabelle 25).

2.3 Validierung des Basophilen Aktivierungstests für phenolische Erdbeerextrakte

Basophile Granulozyten der beiden Probandengruppen wurden mittels Durchflusszytometrie eindeutig identifiziert, da sie getrennt von den anderen Blutzellen unter Verwendung des Selektionsmarkers CCR3 nachgewiesen wurden. CCR3 wurde mit einem monoklonalen Antikörper Anti-CCR3-PE nachgewiesen und die Anzahl der markierten Zellen sind im linken oberen Quadranten, dem Kanal für Anti-CCR3-PE, durch ein Quadrat markiert, sichtbar (Abbildung 19). Aktivierte Basophile wurden mit Anti-CD63-FITC markiert, sind im oberen rechten Quadranten (Q2) erkennbar und wurden in einer Population von 500 Zellen durch das Durchflusszytometer gezählt (Abbildung 19) (Eberlein, Suarez et al. 2010). Der Prozentsatz an CD63+ Zellen repräsentiert die Menge an aktivierten basophilen Granulozyten. Sie wurden in den Blutproben aller Probanden nach Stimulation mit den Proteinen im phenolischen Proteinextrakt von 15 natürlich vorkommenden rot- und weiß-fruchtigen Erdbeergenotypen, pQE70 EV und zwei Positiv- (anti-FcεRI, fMLP) und einer Negativkontrolle des Kits FlowCAST® quantifiziert. Bei den 15, mittels Western Blot Analyse, ausgewählten Erdbeergenotypen handelt es sich um die Genotypen rot-fruchtiger Wildtyp der Walderdbeere *F. vesca* (WT; unbeschriebene Sorte), *F. xananassa* cv. Elsanta und *F. xananassa* cv. Mara des Bois, welche als Positivkontrollen im BAT eingesetzt werden. Die potenziell hypoallergenen Erdbeergenotypen basierend auf dem niedrigen Gehalt an Fra a 1 in der Western Blot Analyse sind die Genotypen *F. vesca* 'Hawaii 4', *F. vesca* cv. Yellow Wonder, *F. vesca* '185', *F. nilgerrensis* 'Dickore 1', *F. nilgerrensis* 'Dickore

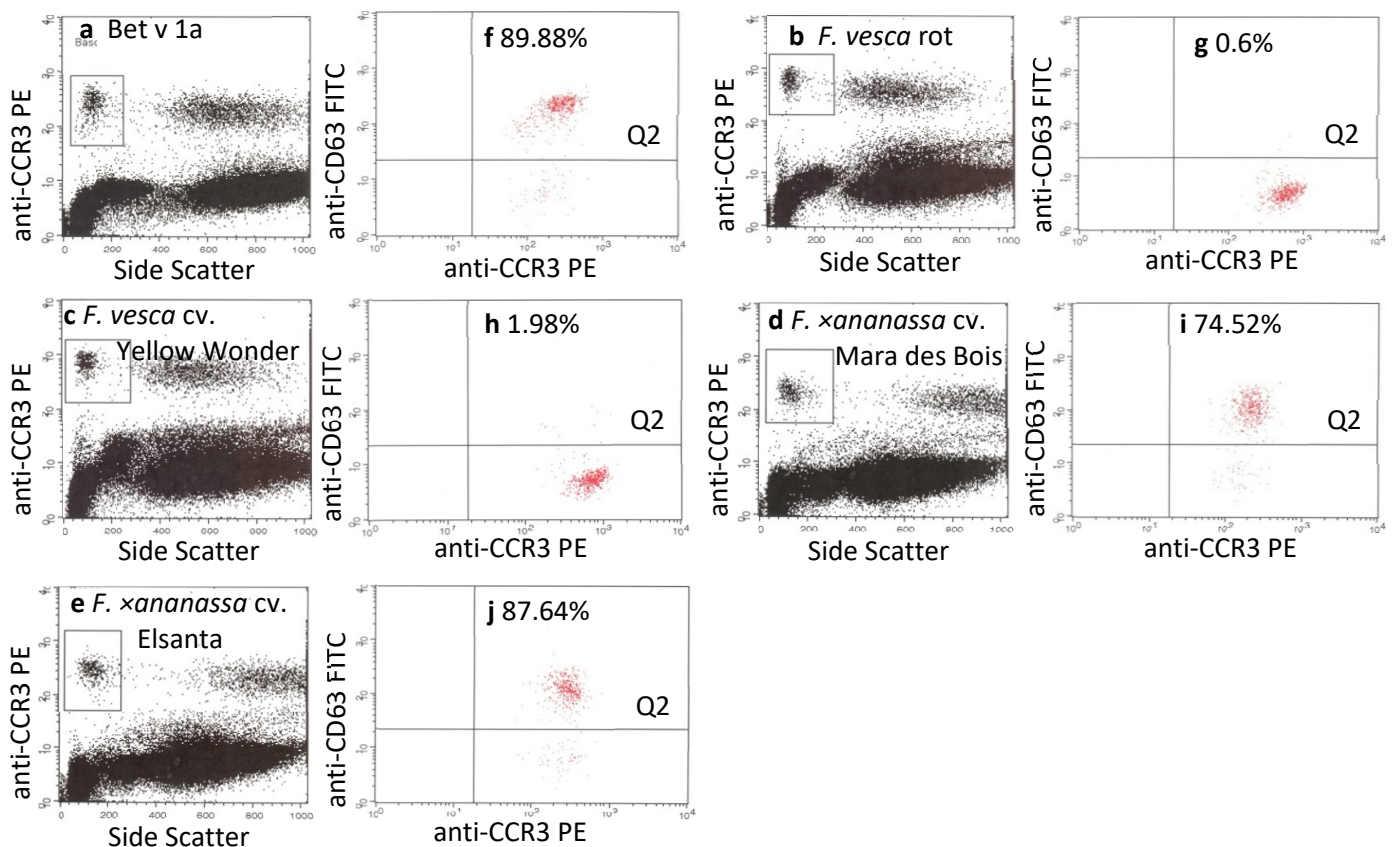


Abbildung 19 Durchflusszytometrische Analyse. Dot-Plot Beispiele des BAT unter Verwendung des CCR3-Selektionsmarkers mit Basophilen eines Birkenpollenallergikers nach Inkubation mit der Positivkontrolle Bet v 1a (a), einem phenolischen Extrakt von *F. vesca* rot-fruchtiger WT (rot) (b), *F. vesca* cv. Yellow Wonder (c), *F. xananassa* cv. Mara des Bois (d) und *F. xananassa* cv. Elsanta (e) bei einer Konzentration von 1000 ng/ml (beispielhafte Auswahl). Nachweis von aktivierten Basophilen durch CD63+ Expression auf Anti-CCR3-markierten Basophilen (f-j). Aktivierte basophile Granulozyten (f-j) werden als Prozentsatz von CD63+ positiven Zellen im oberen rechten Quadranten (Q2) ausgedrückt. Ein Ergebnis $\geq 15\%$ der CD63+ positiven Zellen wurde als positiv angesehen.

2', *F. nilgerrensis* `Mt. Omei 1', *F. nilgerrensis* `Mt. Omei 2', *F. nilgerrensis* `Yunnan 3', *F. nilgerrensis* `St. 94/04-1', *F. nilgerrensis* `St. 98/2-1', *F. nilgerrensis* `Leigong 2' und *F. xananassa* `P-100693'.

Tabelle 26 CD63+ Basophilenaktivierung von atopischen (n = 8) und nicht-atopischen (n = 2) Probanden durch Bet v 1a und verschiedenen natürlich vorkommenden weiß- und rot-fruchtigen Erdbeergenotypen (c = 1000 ng/ml), zwei Positivkontrollen und einer Negativkontrolle (Blindwert; * weiß-fruchtige Erdbeergenotypen; *Fragaria* Genotypen ohne * produzieren rote Früchte).

Stimulus	CD63+ Mittelwert [%] atopische Gruppe	SD [%] atopische Gruppe	CD63+ Mittelwert [%] nicht-atopische Gruppe	SD [%] nicht-atopische Gruppe
Bet v 1a	55,39	0,21	0,20	0,002
<i>F. vesca</i> rot	44,44	0,40	0,52	0,004
<i>F. vesca</i> `Hawaii 4'*	54,45	0,35	1,58	0,01
<i>F. vesca</i> cv. Yellow Wonder*	36,35	0,34	0,26	0,0005
<i>F. vesca</i> `185'*	75,93	0,27	0,84	0,003
<i>F. nilgerrensis</i> `Dickore 1'*	56,70	0,37	0,33	0,0007
<i>F. nilgerrensis</i> `Dickore 2'*	54,85	0,40	1,07	0,002
<i>F. nilgerrensis</i> `Mt. Omei 1'*	46,01	0,34	0,80	0,003
<i>F. nilgerrensis</i> `Mt. Omei 2'*	81,98	0,15	0,32	0,004
<i>F. nilgerrensis</i> `Yunnan 3'*	59,36	0,41	0,74	0,007
<i>F. nilgerrensis</i> `St.94/04-1'*	80,82	0,24	1,84	0,01
<i>F. nilgerrensis</i> `St.98/2-1'*	79,03	0,27	0,51	0,003
<i>F. nilgerrensis</i> `Leigong 2'*	84,16	0,17	3,07	0,02
<i>F. xananassa</i> `P-100693'*	53,42	0,31	0,40	0,003
<i>F. xananassa</i> cv. Elsanta	67,12	0,20	0,50	0,004
<i>F. xananassa</i> cv. Mara des Bois	75,84	0,10	0,48	0,007
FceRI	79,56	0,19	82,82	0,13
fMLP	40,77	0,30	29,17	0,30
Negativkontrolle	0,11	0,002	0,31	0,004

Das allergene Potential der phenolischen Extrakte von zehn Erdbeersorten spiegelte sich durch die höchste Basophilenaktivierung nach Stimulierung der basophilen Granulozyten mit der höchsten Konzentration von 1000 ng/ml und einer deutlichen Dosis-Wirkungs-Beziehung wider (siehe Anhang V.2, Abbildung 40, Abbildung 41). Die übrigen fünf Erdbeergenotypen (*F. vesca* `185', *F. nilgerrensis* `Mt. Omei 2', *F. nilgerrensis* `St. 98/2-1', *F. nilgerrensis* `Leigong 2' und *F. xananassa* cv. Elsanta) zeigten eine parabelförmige Kurve mit der höchsten Basophilenaktivierung bei einer Konzentration von 250 ng/ml oder 500 ng/ml. Das Allergen rBet v 1a diente als Positivkontrolle auch bei der Untersuchung des allergenen Potentials der Erdbeergenotypen, bei welcher höhere Konzentrationen an Stimulanz eingesetzt wurden. Eine Konzentration von 500 ng/ml von rBet v 1a führte zu der höchsten Aktivierung der basophilen Granulozyten. rBet v 1a blieb jedoch auch bei den anderen eingesetzten Konzentrationen auf einem hohen Niveau (siehe Anhang V.2, Abbildung 40, Abbildung 41). Die Basophilen der Kontrollgruppe (nicht-atopische Probanden) wurden weder durch eine Stimulierung mit rBet v 1a noch durch die der phenolischen Extrakte von 15 verschiedenen Erdbeergenotypen aktiviert (Tabelle 26). Die Aktivierung von basophilen Granulozyten von atopischen Probanden durch phenolische Extrakte aus Erdbeerfrüchten mit der Stimulanz-Konzentration von 1000 ng/ml konnte eindeutig nachgewiesen werden. Die gemessenen aktivierten Basophilen bewegten sich in einem Bereich von 36% bis 84% (Tabelle 26).

2.4 Basophiler Aktivierungstest der acht rekombinanten Fra a 1 Proteine

Eine Stimulation der basophilen Granulozyten mit rBet v 1a, dem Selektionskriterium nach welchem die Probanden ausgewählt wurden, führte zu einer deutlichen Stimulation der CD63+ aktivierten Basophilen mit einem Median von etwa 40% (Abbildung 20). Die Isoform rFra a 1.07 zeigte einen ähnlichen Median wie rBet v 1a, jedoch auch eine höhere biologische Variabilität. Bei den Proteinen rFra a 1.04 und rFra a 1.05 könnte es sich um hypoallergene Isoformen handeln, da sie eine CD63+ Basophilenaktivierung von <15% aufweisen (Abbildung 20, II.4.1.27.d). Die drei rekombinanten Proteine Fra a 1.06, Fra a 1.01E und Fra a 1.08 zeigten ein geringes allergenes Potential mit einem Mittelwert von 25% bis 37%, einem Median von etwa 16% bis 30% und eine hohe biologische Variabilität. Diese drei Proteine aktivierten die Basophilen bei vier von acht atopischen Probanden. Die verbleibenden zwei Proteine, rFra a 1.02 und rFra a 1.03, wiesen das höchste allergene Potential auf. Sie führten zu einer CD63+ Aktivierung von Basophilen mit einem Mittelwert von 66% bzw. 73%, einem Median bei 70% bzw. 80%, aber auch einer deutlichen biologischen Variabilität. Jeder atopische Proband zeigte nach der Inkubation mit rFra a 1.03 eine ausgeprägte Basophilenaktivierung und sieben von acht atopischen Patienten zeigten eine deutliche Aktivierung der basophilen Granulozyten nach Stimulation mit rFra a 1.02. Somit scheinen rFra a 1.02 und rFra a 1.03 die Proteine in der Erdbeerfrucht zu sein, die das höchste allergene Potential aufweisen.

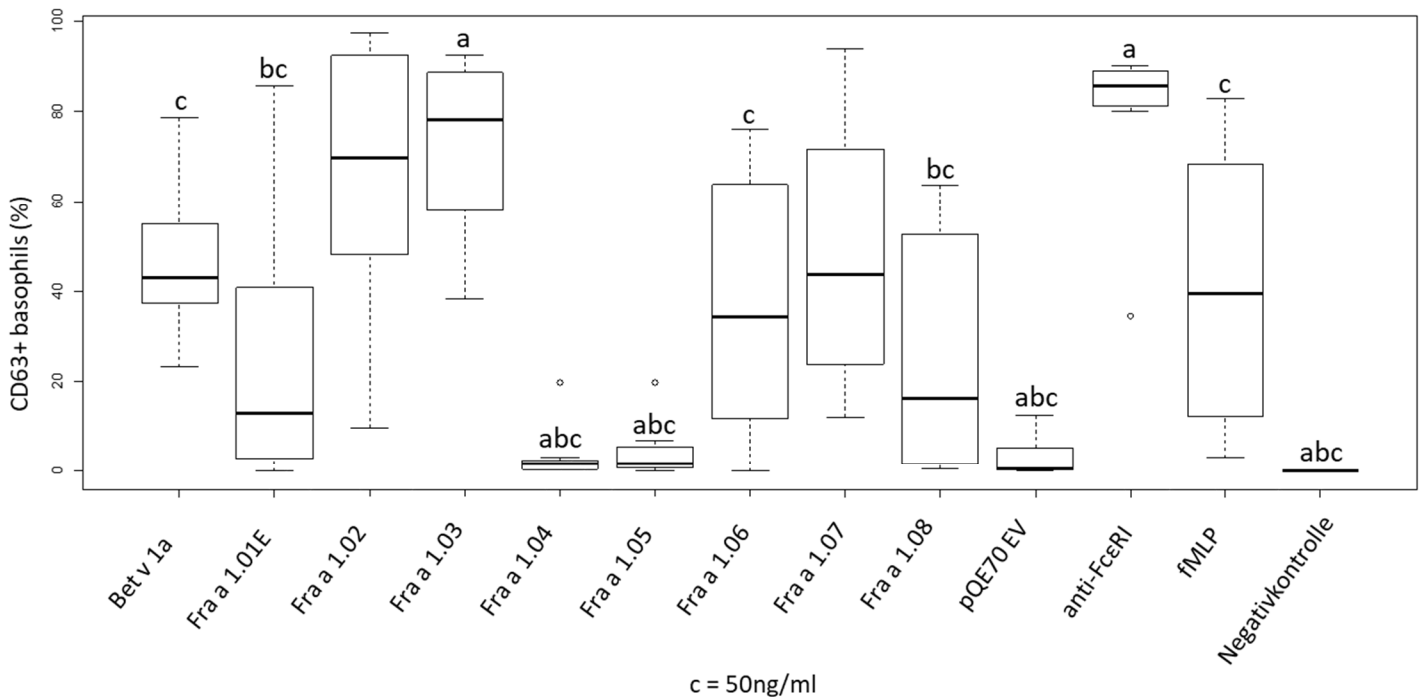


Abbildung 20 Basophilenaktivierung im BAT mit rekombinanten Fra a 1 Proteinen bei Birkenpollenallergikern (n = 8) nach Inkubation mit Bet v 1a, acht Fra a 1 Isoformen, zwei Positivkontrollen (Anti-FcεRI und fMLP), pQE70-Leervektor (EV) und der Negativkontrolle (Blindwert) bei einer Konzentration von 50 ng/ml. P-Werte für den Vergleich von CD63+ positiven Basophilen wurden mittels Student t-Test berechnet. Der p-Wert von ≤0,05 bezogen auf (a) Bet v 1a, (b) Fra a 1.02 und (c) Fra a 1.03 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

Das rFra a 1.01E zeigte, im Gegensatz zu den anderen untersuchten Isoformen, bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 500 ng/ml eine CD63+ Basophilenaktivierung von ca. 85% und somit eine um 69% höhere Basophilenaktivierung als mit einer Konzentration von 50 ng/ml (Abbildung 21). Das rekombinante Protein Fra a 1.01E weist bei einer Konzentration von 500 ng/ml somit das gleiche allergene Potential wie rFra a 1.02 und rFra a 1.03 bei dieser Stimulanz-Konzentration auf. Atopische Patienten, welche in der Anamnese eine RA und OAS gegenüber Erdbeerfrüchten angegeben hatten, zeigten im Allgemeinen eine höhere Aktivierung der Basophilen.

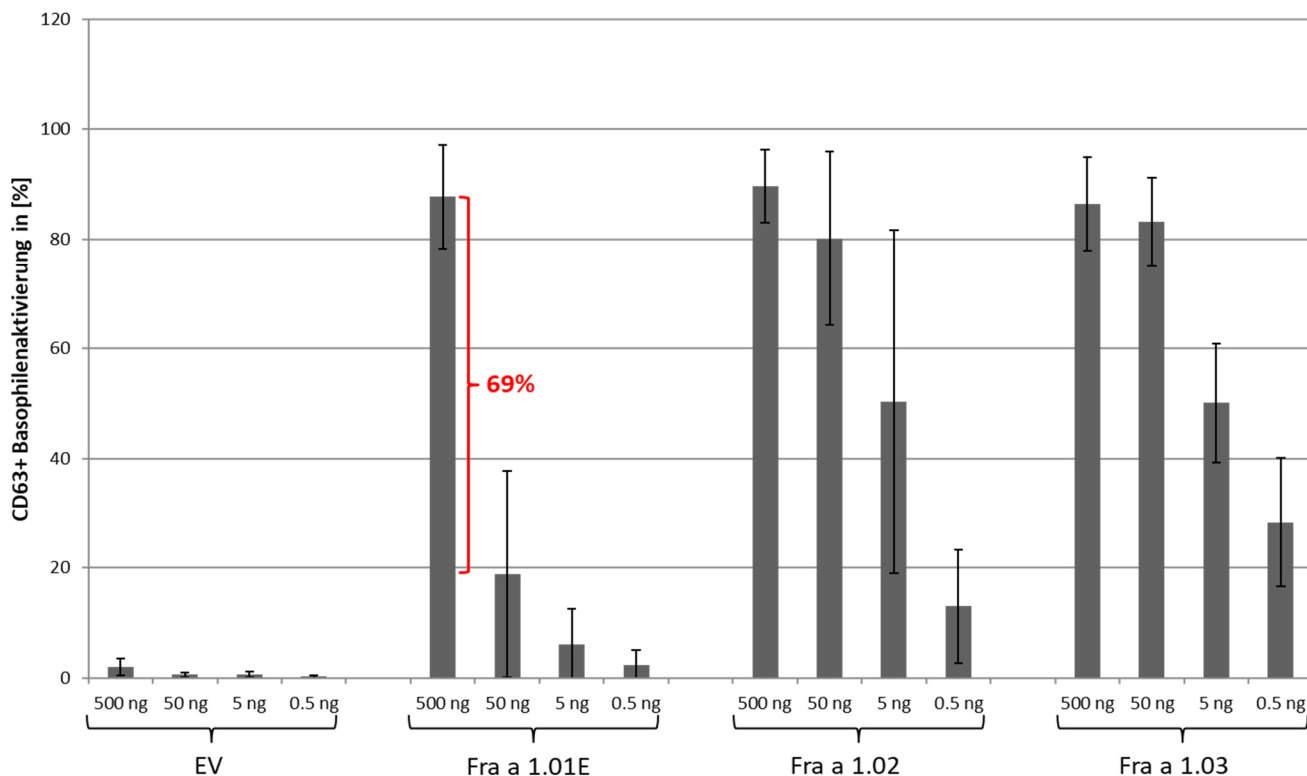


Abbildung 21 Basophilenaktivierung im BAT mit Vollblut von Birkenpollenallergikern (n = 8) nach Inkubation mit rekombinanten Fra a 1.01E, Fra a 1.02 und Fra a 1.03 Proteinen und dem Leervektor pQE70 (EV) als Negativkontrolle mit vier verschiedenen Konzentrationen von 500 ng, 50 ng, 5 ng und 0,5 ng.

Die Berechnung der p-Werte der Basophilenaktivierung durch rBet v 1a, rFra a 1.02 und rFra a 1.03 gegen alle getesteten rekombinanten Proteine und die eingesetzten Kontrollen bestätigten, dass nur rFra a 1.04, rFra a 1.05, pQE70 EV und die Negativkontrolle des FlowCAST® Kits ein signifikant niedriges allergenes Potential aufweisen.

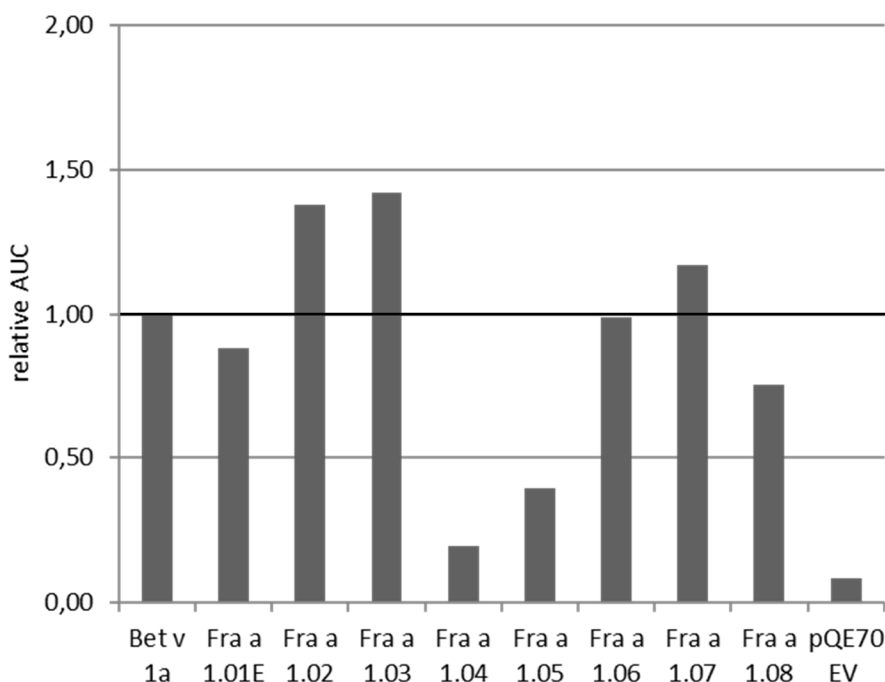


Abbildung 22 Basophilenaktivierung im BAT mit rekombinanten Fra a 1 Proteinen. Die relative Fläche unter der Kurve (AUC) der ermittelten aktivierten CD63+ Basophilenergebnisse. AUC der Proben wurden gegen Bet v 1a normalisiert.

Da die Basophilenaktivierung stark von der Konzentration der Allergene abhängt, wurde die relative Fläche unter der Kurve (AUC; Abbildung 22) berechnet, da sie auch die Konzentrationsabhängigkeit berücksichtigt. Wenn die AUC von rBet v 1a auf 1 gesetzt wird, wird offensichtlich, dass es sich bei rFra a 1.04 und rFra a 1.05 um hypoallergene Isoformen handelt. Die Proteine rFra a 1.01E, rFra a 1.06, rFra a 1.07 und rFra a 1.08 sind dem allergenen Potential von rBet v 1a hingegen sehr ähnlich. Die Proteine rFra a 1.02 und rFra a 1.03 weisen hingegen das höchste allergene Potential der untersuchten Isoformen auf. Somit könnte es sich bei den beiden Isoformen rFra a 1.02 und rFra a 1.03 um die Haupt-Erdbeerallergene handeln.

2.5 Verifizierung des Haupt-Erdbeerallergens mittels einer qRT-PCR Analyse

Eine quantitative Real-Time PCR Analyse wurde durchgeführt, um das postulierte Haupt-Erdbeerallergen zu verifizieren. Die relative Genexpression beider *Fra a 1.02* und *Fra a 1.03* Gene wurde ermittelt, da im BAT gezeigt werden konnte, dass die rekombinanten Proteine der beiden Gene ein hohes allergenes Potential aufweisen und die jeweiligen Gene somit für starke Allergene kodieren (Abbildung 20, Abbildung 22). Das Transkriptionslevel von *Fra a 1.01E* wurde ebenfalls in die Untersuchung mit einbezogen und quantifiziert, da das kodierte Protein zuvor als Haupt-Erdbeerallergen bezeichnet wurde (Karlsson, Alm et al. 2004, Hjernø, Alm et al. 2006, Musidlowska-Persson, Alm et al. 2007). *Fra a 1.01E* wird hauptsächlich in der Wurzel und *Fra a 1.03* in offenen Blüten exprimiert. Das Gen *Fra a 1.02* weist die höchste relative Genexpression in der roten reifen Erdbeerfrucht auf (Abbildung 12) (Muñoz, Hoffmann et al. 2010). Die relative Genexpression der Zielgene *Fra a 1.01E/1.02/1.03* wurde in den reifen Früchten von *F. vesca* rot-fruchtiger WT, *F. vesca* cv. Yellow Wonder und *F. xananassa* cv. Elsanta und cv. Mara des Bois ermittelt. Diese Erdbeersorten wurden für die relative Genexpressionsanalyse ausgewählt, da die Sorten *F. vesca* rot-fruchtiger WT und *F. vesca* cv. Yellow Wonder bei dem Skin-Prick-Test (SPT; Tabelle 5, III.2.1, II.1.3) nur eine geringe Reaktion bei den atopischen Probanden hervorgerufen hatten und womöglich ein geringeres allergenes Potential aufweisen. Der phenolische Proteinextrakt der reifen Früchte der octaploiden

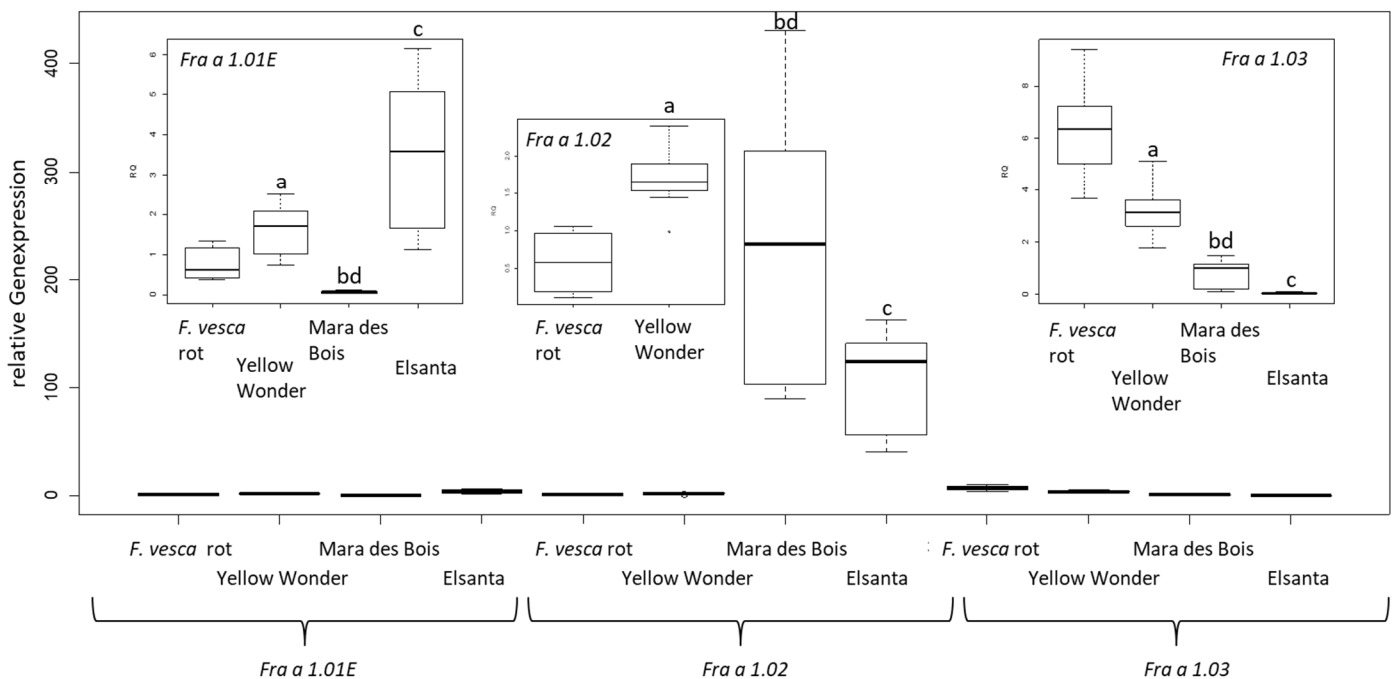


Abbildung 23 Quantitative RT-PCR Analyse der Zielgene in *F. vesca* rot-fruchtiger WT (rot), *F. vesca* cv. Yellow Wonder, *F. xananassa* cv. Mara des Bois und cv. Elsanta. Zielgene der qRT-PCR Analyse waren die Gene *Fra a 1.01E/1.02/1.03*. P-Werte für den Vergleich der relativen Expression der Zielgene in vier Erdbeergenotypen wurden mittels ungepaarten t-Test berechnet. Der p-Wert von $\leq 0,05$ bezogen auf (a) *Fv* rot vs. *Fv* cv. Yellow Wonder, (b) *Fv* rot vs. *Fa* cv. Mara des Bois, (c) *Fv* rot vs. *Fa* cv. Elsanta, (d) *Fa* cv. Elsanta vs. *Fa* cv. Mara des Bois wurde als statistisch signifikant betrachtet.

F. xananassa cv. Elsanta und cv. Mara des Bois führten bei dem SPT zu einer starken Reaktion bei den atopischen Probanden und weisen vermutlich ein hohes allergenes Potential auf.

Der Median der relativen Genexpression von *Fra a 1.01E* und *Fra a 1.03* überstieg in den vier untersuchten Sorten nicht den Wert von 4 bzw. 6 (Abbildung 23). Das relative Genexpressionslevel von *Fra a 1.02* in *F. vesca* rot-fruchtiger WT und *F. vesca* cv. Yellow Wonder erreichte nur die Werte von 0,5 bzw. 1,7. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen waren die Werte des Medians der Transkriptmengen von *Fra a 1.02* in den beiden *F. xananassa* Kultivaren Mara des Bois und Elsanta fast 220- bzw. 110-fach höher als in beiden *F. vesca* Kultivaren. Die statistische Analyse ergab, dass die relative Genexpression der drei Zielgene *Fra a 1.01E*, *Fra a 1.02* und *Fra a 1.03* in *F. vesca* rot-fruchtiger WT verglichen mit den anderen drei Erdbeersorten sowie zwischen den beiden *F. xananassa* Kultivaren Elsanta und Mara des Bois statistisch signifikant sind (p-Werte <0,05).

Da *Fra 1.02* in den roten reifen Früchten von *F. xananassa* cv. Elsanta und cv. Mara des Bois (Abbildung 23) sehr stark exprimiert wird, die atopischen Probanden eine starke Reaktion während des Skin-Prick-Tests gegen die phenolischen Extrakte von *F. xananassa* cv. Elsanta und cv. Mara des Bois (II.1.3) aufwiesen und rFra a 1.02 im BAT ein hohes allergenes Potential gezeigt hat, wird angenommen, dass die Isoform *Fra a 1.02* das Haupt-Erdbeerallergen der PR-10 Subfamilie der Bet v 1-homologen Proteine ist.

2.6 Identifizierung von möglichen hypoallergenen Erdbeergenotypen

Da ein natürlich vorkommender, weiß-fruchtiger Erdbeergenotyp von Erdbeerallergikern toleriert wurde und das Erdbeerallergen *Fra a 1* sowie die wichtigsten Enzyme des Anthocyan-Biosyntheseweges in diesem Genotyp fehlten, wurde auf der Suche nach weiteren hypoallergenen Erdbeersorten ein Screening von 51 weiß-fruchtigen Erdbeergenotypen durchgeführt (Hjernø, Alm et al. 2006) (II.1.1.1). Die phenolischen Proteinextrakte von *F. vesca* rot-fruchtiger WT, *F. xananassa* cv. Elsanta und cv. Mara des Bois dienten als Kontrollen. Das für die Proteinextraktion mit Hilfe von Phenol verwendete Protokoll ist vor allem dafür geeignet kleine Proteine wie die *Fra a 1* Isoformen zu extrahieren (Karlsson, Alm et al. 2004) (II.4.2.1) Die Proteinextrakte (jeweils 5 µg) wurden durch ein kontinuierliches 12%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Silberfärbung und Western Blot Analyse unter Verwendung des primären polyklonalen Anti-*Fra a 1.02* Antikörpers und des sekundären monoklonalen Anti-rabbit IgG AP-Konjugat Antikörpers (II.1.13) untersucht und visualisiert. Die phenolische Proteinextraktion, Silberfärbung und Western Blot Analyse wurde zweimal mit biologischen Replikaten durchgeführt. Drei klare Banden in unterschiedlich starken Ausprägungen

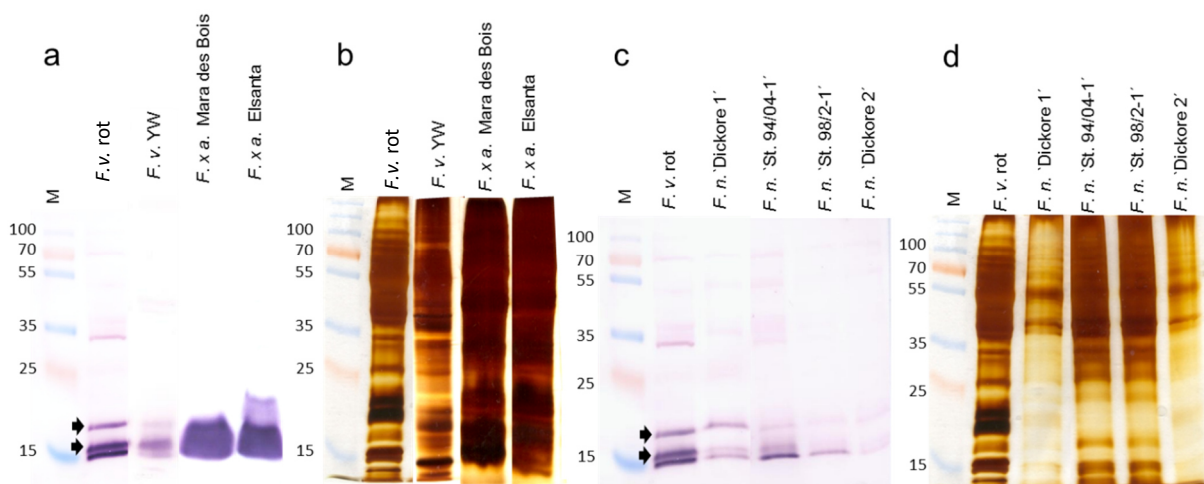


Abbildung 24 SDS-PAGE und Western Blot Analyse von den phenolischen Extrakten verschiedener Erdbeergenotypen (5 µg). a und c. Der Western Blot wurde mit dem polyklonalen Anti-*Fra a 1.02* Antikörper detektiert. M: Proteinmarker (Abbildung 16 b; Proteingröße in kDa); *F.v. rot*: *F. vesca* rot-fruchtiger WT; *F.v. YW*: *F. vesca* cv. Yellow Wonder; *F.x.a. Mara des Bois*: *F. xananassa* cv. Mara des Bois; *F.x.a. Elsanta*: *F. xananassa* cv. Elsanta; *F.n. 'Dickore 1'*: *F. nilgerrensis* 'Dickore 1'; *F.n. 'St 94/04-1'*: *F. nilgerrensis* 'St. 94/04-1'; *F.n. '98/2-1'*: *F. nilgerrensis* 'St. 98/2-1'; *F.n. 'Dickore 2'*: *F. nilgerrensis* 'Dickore 2'. b und d: Die SDS-PAGE wurde mittels Silberfärbung visualisiert.

wurden durch die Western Blot Analyse in fast allen Erdbeerproteinextrakten bei ca. 15, 18 und 20 kDa nachgewiesen (Abbildung 24, Tabelle 27).

Tabelle 27 Relative Intensitäten der 18 und 20 kDa Banden im Western Blot Screen für hypoallergene Erdbeersorten. (* Weiß-fruchtige Erdbeersorten, *Fragaria* Varietäten ohne Sternchen produzieren rote Früchte)

Erdbeervarietäten	18 kDa Bande	20 kDa Bande
<i>F. vesca</i> rot-fruchtig Wildtyp	Referenz (\cong 1)	Referenz (\cong 1)
<i>F. x ananassa</i> cv. Elsanta	>>1	>>1
<i>F. x ananassa</i> cv. Mara des Bois	>>1	>>1
<i>F. x ananassa</i> `P-100693`*	>>1	>>1
<i>F. vesca</i> `Hawaii 4`*	<1	<1
<i>F. vesca</i> cv. Yellow Wonder*	<1	<1
<i>F. vesca</i> `185`*	<1	<1
<i>F. nilgerrensis</i> `Dickore 1`*	<1	<1
<i>F. nilgerrensis</i> `Dickore 2`*	<<1	<<1
<i>F. nilgerrensis</i> `Mt. Omei 1`*	<<1	<<1
<i>F. nilgerrensis</i> `Mt. Omei 2`*	<1	<1
<i>F. nilgerrensis</i> `Yunnan 3`*	<<1	-
<i>F. nilgerrensis</i> `St. 94/04-1`*	<1	<1
<i>F. Nilgerrensis</i> `St. 98/2-1`*	<<1	<<1
<i>F. nilgerrensis</i> `Leigong 2`*	<1	<<1

Die in den Banden enthaltenen Proteine wurden nach einem tryptischen Verdau mittels Massenspektrometrie sequenziert (II.4.1.23, II.4.1.24). Die detektierten Aminosäuresequenzen wurden mit der translatierten *F. vesca* Genomsequenz (Shulaev, Sargent et al. 2011) und den *F. xananassa* cv. Elsanta Proteinsequenzen von Fra a 1.01E-1.08 verglichen (Searle 2010).

Beide Proteinspots bei 18 kDa und 20 kDa enthielten das Peptid AFVLDADNLIPIK und zusätzliche spezifische Peptide, welche für die Fra a 1 Isoformen eine 68%-ige Sequenzübereinstimmung ergaben. Die ermittelten Ergebnisse stimmten sowohl gut mit der *in silico* berechneten Molekülmasse der Fra a 1 Proteine (17,3 kDa bis 21,7 kDa; (Hyun and Kim 2011) als auch mit den bereits durchgeführten Analysen der Erdbeerallergene überein (Karlsson, Alm et al. 2004). Der Proteinspot bei 15 kDa repräsentierte ein spezifisches Peptid für Calmodulin-2/3/5 (Gen10223) (Shulaev, Sargent et al. 2011). Von 51 phenolischen Proteinextrakten von Erdbeerfrüchten verschiedener Genotypen zeigten elf Proben wiederholt niedrigere Werte für beide, 18 kDa und 20 kDa, Fra a 1 Proteine, verglichen mit dem Extrakt aus *F. vesca* rot-fruchtiger WT (Tabelle 27). Die weiß-fruchtige *F. xananassa* `P-100693` und die rot-fruchtigen *F. xananassa* Kultivare Elsanta und Mara des Bois, welche als Positivkontrollen dienten, produzierten größere Mengen an Fra a 1 Proteinen als die *F. vesca* rot-fruchtige WT Kontrolle. Zwölf weiß-fruchtige Erdbeergenotypen und die drei Positivkontrollen *F. vesca* rot-fruchtiger WT,

F. xananassa cv. Mara des Bois und cv. Elsanta wurden in den Basophilen Aktivierungstest aufgenommen (Tabelle 27).

2.7 Basophilen Aktivierungstest von phenolischen Proteinextrakten

Die Anzahl der Basophilen in Prozent, die durch phenolische Proteinextrakte verschiedener Erdbeergenotypen bei einer Konzentration von 1000 ng/ml aktiviert wurden, einschließlich der Positiv- und Negativkontrollen, wurden als Box Plot visualisiert (Abbildung 25). Die Positivkontrollen rBet v 1a, anti-FcεRI, fMLP und die Negativkontrolle des FlowCAST®-Kits (Waschpuffer) bestätigten die Zuverlässigkeit und Stabilität des Tests (Tabelle 25, III.2.2). Die Stimulation der Basophilen mit rBet v 1a, dem Selektionskriterium der atopischen Probanden, führte zu einer CD63+ Aktivierung mit einem Median von etwa 56% und zeigte eine hohe biologische Variabilität innerhalb der atopischen Probandengruppe (Abbildung 25). Durch die phenolischen Proteinextrakte der octaploiden *F. xananassa* Kultivare Elsanta und Mara des Bois und auch von der neuen Züchtungsakzession *F. xananassa* `P-100693` wurde eine hohe Anzahl an basophilen Granulozyten von 53% bis 75% in der atopischen Probandengruppe aktiviert und sie wiesen einen Median bei 62% bis 74% auf. Die beiden

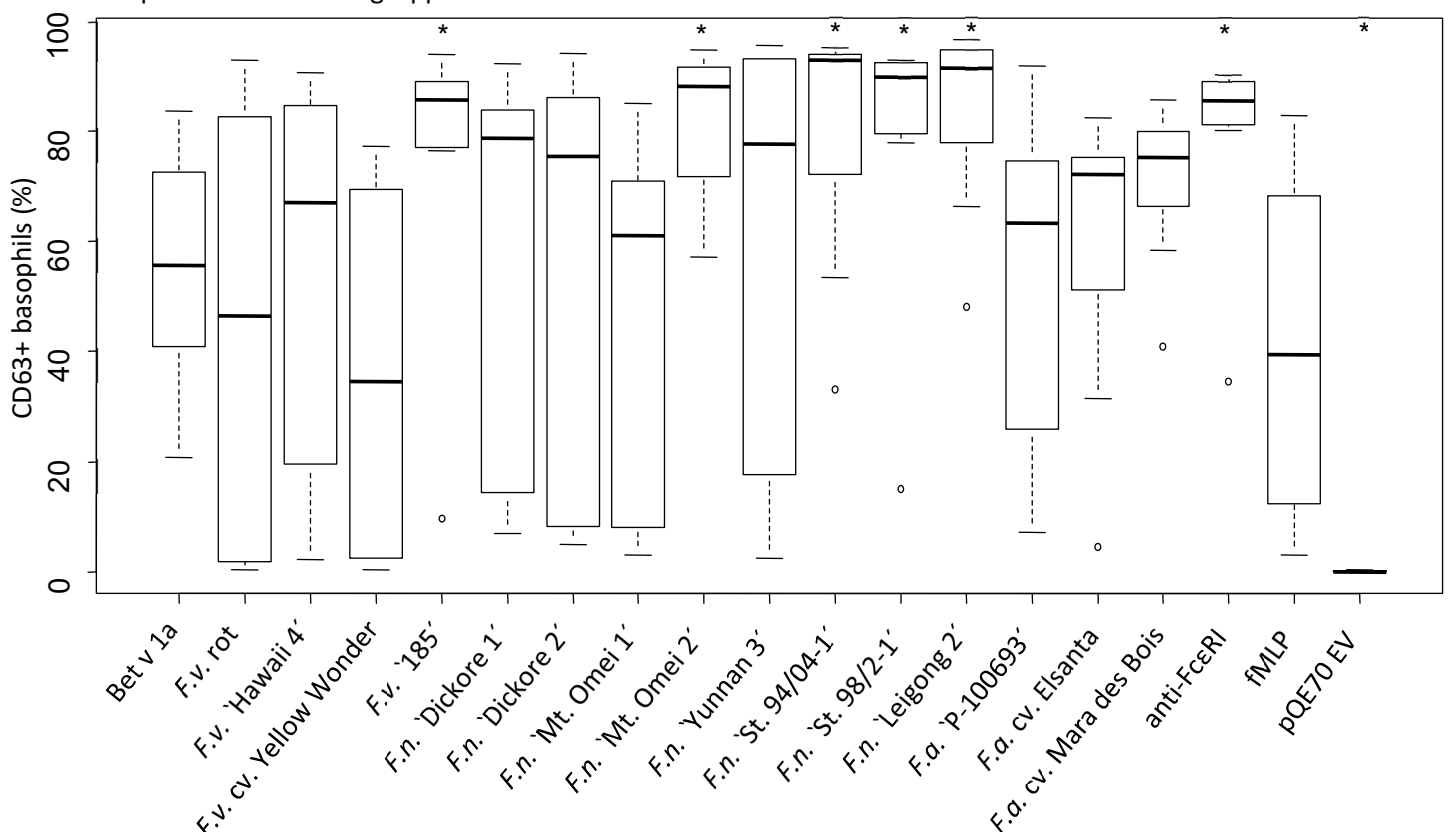


Abbildung 25 Basophilenaktivierung im BAT mit phenolischen Extrakten von natürlich vorkommenden weiß- und rot-fruchtigen Erdbeergenotypen. CD63+ Aktivierung im BAT in Vollblut von Birkenpollenallergikern (n = 8) nach Inkubation mit jeweils 1000 ng/ml Bet v 1a, phenolische Extrakte aus natürlich vorkommenden weiß- und rot-fruchtigen *Fragaria vesca* (F.v.), *Fragaria nilgerrensis* (F.n.) und *Fragaria xananassa* (F.a.), zwei Positivkontrollen (anti-FcεRI und fMLP) und einer Negativkontrolle (pQE70 EV). P-Werte für den Vergleich der Basophilenaktivierung in den Proben wurden mittels ungepaarten t-Test berechnet. Der p-Wert von ≤0,05 bezogen auf Bet v 1a (*) wurde als statistisch signifikant betrachtet.

Kultivare Elsanta und Mara des Bois zeigten eine geringe biologische Variabilität ganz im Gegensatz zu der neuen Züchtungsakzession `P-100693` (Abbildung 25). Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Ergebnissen des Skin-Prick-Tests mit den atopischen Probanden, welche auch bei den octaploiden *F. xananassa* Kultivaren Elsanta und Mara des Bois die stärksten allergischen Reaktionen zeigten (Tabelle 5, II.1.3). *F. vesca* `185`, *F. nilgerrensis* `Mt Omei 2`, `St. 94/04-1`, `St. 98/2-1` und `Leigong 2` wiesen nur eine geringe biologische Variabilität auf und aktivierten mehr als 75% bis 84% der basophilen Granulozyten in der atopischen Probandengruppe. Der Median dieser Erdbeergenotypen liegt bei ca. 85%. Die weiß-fruchtigen Genotypen *F. vesca* `Hawaii 4` und cv. Yellow Wonder, *F. nilgerrensis* `Dickore 1`, `Dickore 2`, `Mt. Omei 1`, Yunnan 3` und der rot-fruchtige *F. vesca* WT zeigten eine hohe

biologische Variabilität innerhalb der atopischen Probandengruppe (Abbildung 25). Die durch das *F. vesca* cv. Yellow Wonder aktivierten basophilen Granulozyten beliefen sich auf 36% und der Median lag ebenfalls bei ca. 36%. Diese Beobachtung führte zu der Schlussfolgerung, dass *F. vesca* cv. Yellow Wonder das geringste allergene Potential und somit die niedrigste Aktivierung von Basophilen in der atopischen Probandengruppe, welche an einer Allergie gegen Bet v 1-homologe Proteine leiden, aufwies (Tabelle 5, Tabelle 26, II.1.3). Im Gegensatz dazu wurden *F. vesca* `185`, *F. nilgerrensis* `Mt. Omei 2`, `St. 94/04-1`, `St. 98/2-1` und `Leigong 2` als Erdbeergenotypen mit einem hohen allergenen Potential betrachtet. Sie wiesen ein statistisch signifikant höheres allergenes Potenzial im Vergleich zu rBet v 1a auf (Abbildung 25, Tabelle 26).

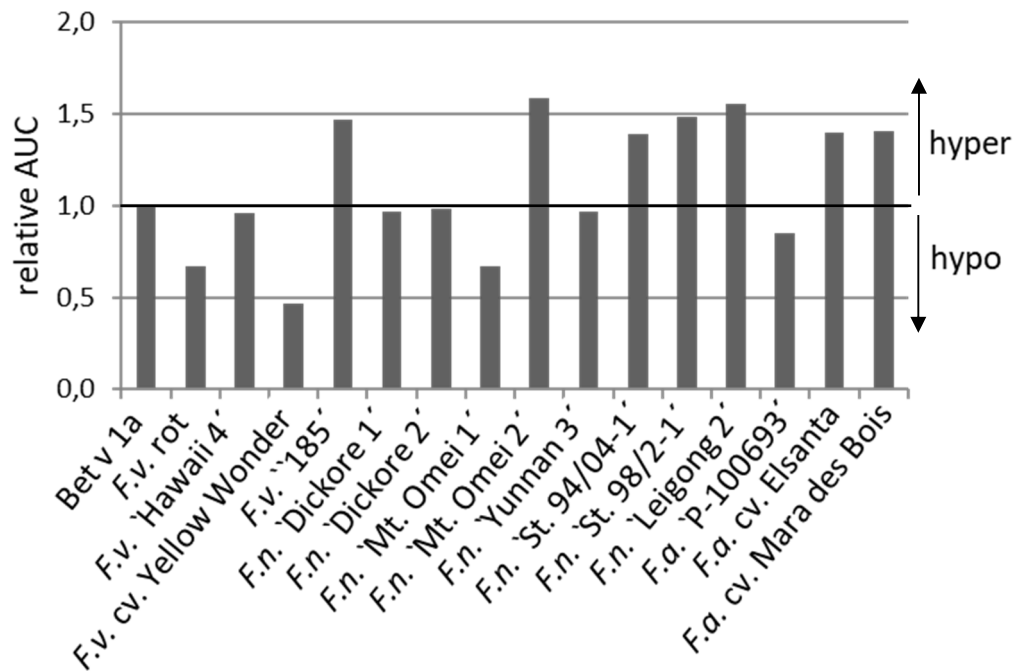


Abbildung 26 Basophilenaktivierung im BAT mit phenolischen Extrakten von natürlich vorkommenden weiß- und rot-fruchtigen Erdbeergenotypen. Die relative Fläche unter der Kurve (AUC) der ermittelten aktivierten CD63+ Basophilenergebnisse. AUC der Proben wurden gegen Bet v 1a normalisiert.

Die Differenzierung der Erdbeergenotypen nach ihrer Fähigkeit basophile Granulozyten zu aktivieren, wird auch durch die Ermittlung der relativen Fläche unter der Kurve (AUC; Abbildung 26) gestützt, welche die Konzentrationsabhängigkeit der im BAT ermittelten Werte berücksichtigt. *Fragaria vesca* cv. Yellow Wonder zeigte den niedrigsten AUC Wert und kann somit als hypoallergene Erdbeersorte angesehen werden, während *F. vesca* `185`, *F. nilgerrensis* `Mt. Omei 2`, `St. 94/04-1`, `St. 98/2-1`, `Leigong 2` und *F. xananassa* cv. Elsanta und cv. Mara des Bois die höchsten AUC Werte aufwiesen und es sich bei diesen um Erdbeergenotypen handelt, welche ein höheres Risiko für die Auslösung allergischer Reaktionen aufweisen.

2.8 Immuno-Tissue-Print (ITP)

Ein Immuno-Tissue-Print Experiment wurde mit reifen, gelben und grünen Früchten von *F. vesca* cv. Yellow Wonder, *F. vesca* rot-fruchtiger WT, *F. xananassa* cv. Elsanta und cv. Mara des Bois durchgeführt. Bei dem ITP sollen die Bet v 1-homologen Proteine in der aufgeschnittenen Erdbeerfrucht lokalisiert werden. Die auf die aktivierte PVDF-Membran mittels Druck übertragenen Fra a 1 Proteine wurden durch den polyklonalen Antikörper Anti-Fra a 1.02 visualisiert (II.4.2.2). Die Fra a 1 Proteine waren in den Früchten der drei Reifestadien und der vier Sorten fast gleichmäßig verteilt (Abbildung 27). Intensivere Signale entstanden, wenn beim Übertragen der Proteine vom Gewebe auf die PVDF-Membran ein größerer Druck ausgeübt wurde (*F. vesca* rot-fruchtiger WT; Abbildung 27b). Die Visualisierung der von *F. vesca* cv. Yellow Wonder übertragenen Fra a 1 Proteine führte zu schwachen Signalen, *F. xananassa* cv. Elsanta und cv. Mara des Bois zeigten, wie zu erwarten

war, starke Signale. Die Allergene waren jeweils in den drei verschiedenen Fruchtreifungsstadien zu erkennen.

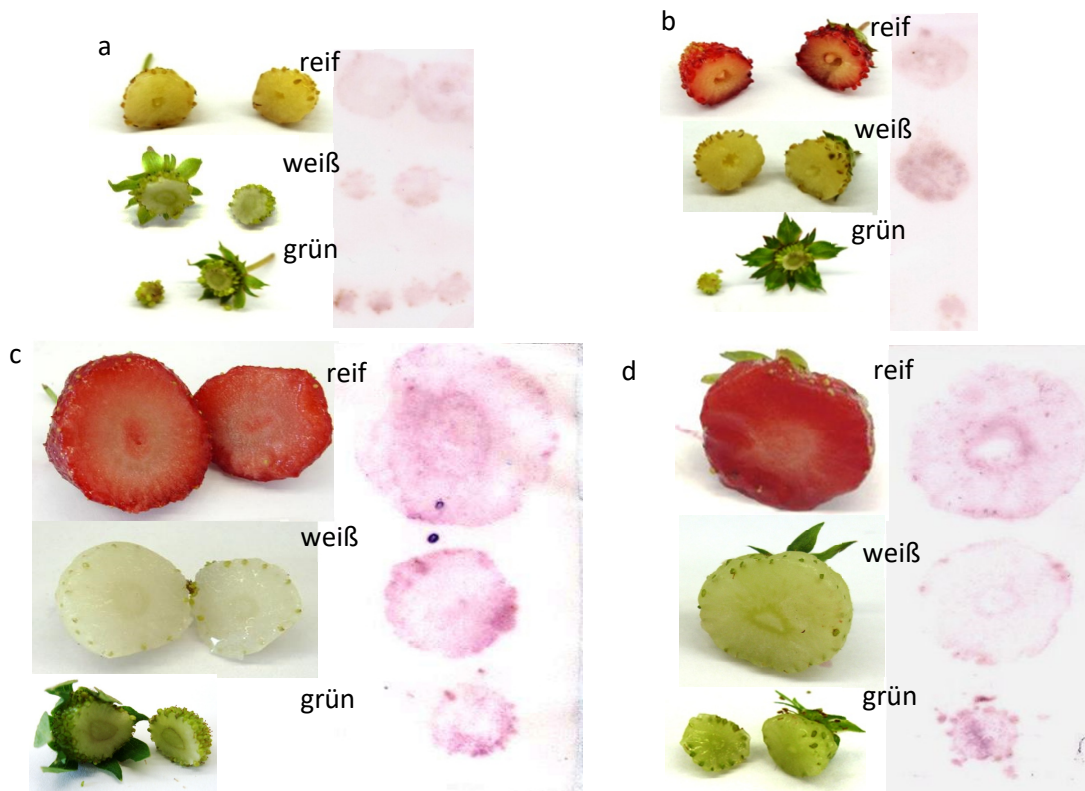


Abbildung 27 Allergenverteilung in verschiedenen Reifungsstadien von aufgeschnittenen Erdbeerfrüchten verschiedener Varietäten mittels ITP. Abdrücke der Erdbeerfruchtscheiben von drei verschiedenen Reifestadien (reif, weiß und grün; senkrecht zur Kernachse) wurden mit dem polyklonalen Antikörper Anti-Fra a 1.02 inkubiert. a: ITP von *F. vesca* cv. Yellow Wonder; b: ITP von *F. vesca* rot-fruchtiger WT; c: ITP von *F. xananassa* cv. Elsanta; d: ITP von *F. xananassa* cv. Mara des Bois.

3. Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen den Fra a 1 Isoformen und FaAP

3.1 In silico Analyse der Sequenz von FaAP

MdAP (*Mal d 1* Assoziiertes Protein) wurde als interagierender Partner von zwei Isoformen des Haupt-Apfelallergens Mal d 1 (Puehringer, Zinoecker et al. 2003) beschrieben. Basierend auf der hohen Homologie zwischen den orthologen Proteinen Bet v 1, Mal d 1 und Fra a 1 (I.2.4.1, I.2.4.2, I.2.3, Abbildung 11) wurde die Genomsequenz von *F. vesca* (Shulaev, Sargent et al. 2011) auf Gene untersucht, die für MdAP homologe Proteine kodieren. Das Gen *FaAP* (*Fra a 1* Assoziiertes Protein) weist eine 69%-ige Nukleotidsequenz Ähnlichkeit zu MdAP auf (Puehringer, Zinoecker et al. 2003), ist 579 bp lang und kodiert für ein Protein von 193 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von

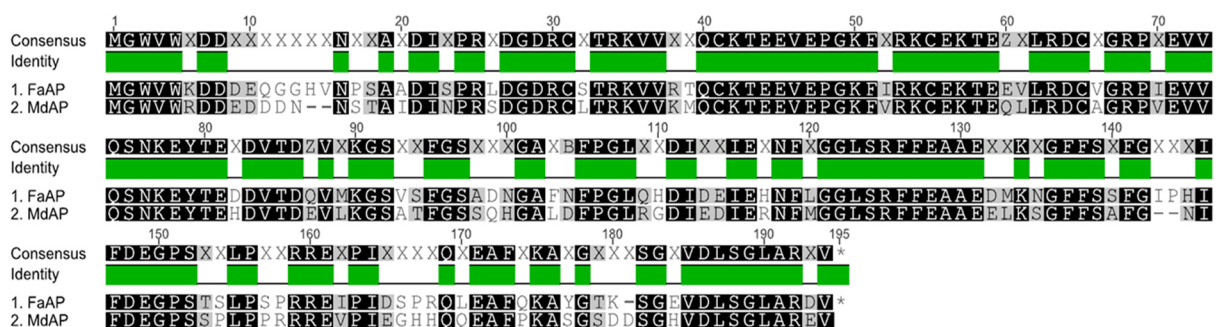


Abbildung 28 Alignment der Proteinsequenzen von FaAP und MdAP

21,461 kDa und einem pI von 4,49 (II.1.2, Tabelle 2, Tabelle 3). FaAP wird ebenso wie MdAP durch ein einzelnes Gen im Genom der Walderdbeere (Shulaev, Sargent et al. 2011) kodiert (Abbildung 28).

Eine BLAST Analyse der FaAP Proteinsequenz bei NCBI lieferte unter anderem Proteinsequenzen von *Solanum lycopersicum* (79% Ähnlichkeit; XM_004249348.1), *Prunus persica* (69% Ähnlichkeit; EMJ03824.1), *Populus trichocarpa* (59% Ähnlichkeit; XP_002323365.1), *Vitis vinifera* (58% Ähnlichkeit; XP_002264531.1) und *Arabidopsis thaliana* (46% Ähnlichkeit; AAD21467.1). Diese Proteinsequenzen werden als hypothetische und vorhergesagte Proteine beschrieben, die eine Homologie zu MdAP aufweisen.

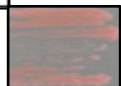
Die genomische DNA (gDNA) von FaAP besteht aus zwei Exons, welche durch ein Intron getrennt sind. Das Intron beginnt nach 204 bp mit der konservierten Spleißstelle GT am Nukleotid 69, hat eine Länge von 1.282 bp und endet mit der Spleißstelle AT. Laut Predict Protein (Rost, Yachdav et al. 2004) wird FaAP vermutlich nicht sekretiert, es handelt sich nicht um ein DNA-bindendes Protein und es enthält kein Kernlokalisierungssignal, obwohl es basierend auf seiner geringen Größe in den Zellkern gelangen könnte.

3.2 In vivo Interaktionsstudie zwischen Fra a 1.01E/1.02/1.03 und FaAP mittels Hefe Zwei-Hybrid

Um Interaktionspartner für die drei Fra a 1 Isoformen zu identifizieren, wurde eine Hefe Zwei-Hybrid Analyse mit Fra a 1.01E, Fra a 1.02, Fra a 1.03 und dem orthologen Protein zu MdAP im Erdbeergenom FaAP durchgeführt. Zusätzlich wurde sowohl die Interaktion zwischen MdAP, dem orthologen Protein in *M. domestica*, und Mal d 1 als auch die bereits erfolgreich nachgewiesene Wechselwirkung zwischen den Proteinen AMSH3 und VPS2.1 als Positivkontrollen mitgeführt (Abbildung 29) (Puehringer,

GBD \ GAD	GAD	Fra a 1.01E	Fra a 1.02	Fra a 1.03	Mal d 1	FaAP	FaAP -N	FaAP -C	MdAP	Positivkontrolle:
GBD										VPS2.1:A MSH3
Fra a 1.01E		/	/	/	/					
Fra a 1.02		/	/	/	/					
Fra a 1.03		/	/	/	/					
Mal d 1		/	/	/	/		/	/		
FaAP						/	/	/	/	
FaAP-N					/	/	/	/	/	
FaAP-C					/	/	/	/	/	
MdAP						/	/	/	/	

Abbildung 29 Hefe Zwei-Hybrid Analyse bei 5 mM 3-AT nach 4 Tagen bei 30°C; Positivkontrolle VPS2.1:AMSH3 (Katsiarimpa, Anzenberger et al. 2011).



Zinoecker et al. 2003, Katsiarimpa, Anzenberger et al. 2011). Die Gene *Fra a 1.01E/1.02/1.03*, *Mal d 1*, *FaAP* und *MdAP* wurden sowohl mit der GB-Domäne (GBD) als auch mit der GA-Domäne (GAD) fusioniert, um die Wechselwirkungen der Proteine in beide Richtungen zu analysieren (GBD:GAD). Eine positive Protein-Protein-Wechselwirkung ist anhand der Größe und Dichte der Kolonien auf dem Minimalmedium zu erkennen (Abbildung 29).

Die Kombination von FaAP:Fra a 1.01E zeigte starkes Wachstum der Hefekolonien, während die Kombination Fra a 1.03:FaAP nur ein Hefezellwachstum aufwies, wenn die beiden Proteine von den jeweils anderen "Köder"- bzw. "Beute"-Vektoren exprimiert werden. Bei der Negativkontrolle, wenn FaAP mit GAD fusioniert und mit dem leeren pGBKT7 (GBD) kotransformiert wurde, lag ein latentes Hefezellwachstum vor. Bei der Negativkontrolle in der Kombination FaAP fusioniert mit GBD und kotransformiert mit dem leeren pGADT7 (FaAP:leer GAD) hingegen wurde eine starke Reporterexpression induziert. Selbst hohe Konzentrationen von 3-AT (20 mM) konnten diese Autoaktivierung nicht unterdrücken. Die Negativkontrollen von Fra a 1.01E/1.02/1.03 in Kombination mit den leeren pGBKT7 (GBD) und pGADT7 (GAD) zeigten nur ein geringes Zellwachstum. Um die Autoaktivität von FaAP zu reduzieren, wurde das Protein FaAP in zwei etwa gleich großen Teilen exprimiert. Das N-terminale FaAP kodiert für 1-291 bp (FaAP-N) und das C-terminale FaAP für 292-582 bp (FaAP-C). Mit diesen beiden Teilen wurde die Transkriptionsaktivierung des GAL4-responsiven Promotors in verschiedenen Kombinationen getestet. FaAP-N und die drei Fra a 1 Isoformen in beiden Vektorkombinationen führten nicht zu einer funktionellen Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors. Bei den Kombinationen von FaAP-C:Fra a 1.01E/1.02/1.03, war vor allem FaAP-C:Fra a 1.01E in der Lage eine Reporterexpression zu induzieren. Die Negativkontrollen der Kombinationen leer GBD:FaAP-N, leer GBD:FaAP-C und FaAP-N:leer GAD zeigten ein kaum vorhandenes Wachstum der Hefezellen. FaAP-C:leer GAD wies hingegen ein starkes Hefezellwachstum, vergleichbar mit FaAP:leer GAD, auf und stellte somit einen starken Transkriptionsaktivator dar (Abbildung 29). Dies lässt vermuten, dass die Aminosäuresequenz, welche für die Autoaktivierungsaktivität von FaAP verantwortlich ist, im C-terminalen Fragment (292-582 bp) von FaAP lokalisiert ist.

Es wurden auch die Kotransformanden Fra a 1:MdAP sowie Mal d 1:FaAP in verschiedenen Kombinationen analysiert, um zu testen, ob FaAP und MdAP, welche eine 69%-ige Aminosäureähnlichkeit zueinander aufweisen, ähnliche Funktionen oder Interaktionsmuster teilen. Obwohl eine Reporterexpression für FaAP:Mal d 1 vorhanden war, ist dieses Zellwachstum sehr wahrscheinlich der Autoaktivierungsaktivität von FaAP zuzuschreiben.

Überraschenderweise konnte die physikalische Wechselwirkung von Mal d 1 und MdAP nicht eindeutig durch die Y2H Analyse bestätigt werden. MdAP zeigte, ähnlich wie FaAP, eine Reporterexpression in Kombination mit dem leeren GAD Vektor (MdAP:leer GAD). Die Autoaktivierungsaktivität von MdAP scheint jedoch im Vergleich zu der Autoaktivierungsaktivität von FaAP schwächer zu sein.

Die bekannte Interaktion von AMSH3 ("Beute") und VPS2.1 ("Köder") diente als Positivkontrolle und die Wechselwirkung der beiden Proteine konnte erfolgreich reproduziert werden (Katsiarimpa, Anzenberger et al. 2011).

Obwohl die Hefe Zwei-Hybrid Analyse einige Hinweise für eine physikalische Wechselwirkung zwischen den drei Fra a 1 Proteinen und FaAP lieferte, konnten die Ergebnisse der Interaktion aufgrund einer hohen Autoaktivierungsaktivität in der C-terminalen Sequenz von FaAP nicht klar nachgewiesen werden. Daher wurde ein alternatives und unabhängiges System zur weiteren Analyse der Protein-Protein-Wechselwirkung eingesetzt.

3.3 *In vitro* Interaktionsstudie zwischen Fra a 1.01E/1.02/1.03 und FaAP mittels „time-resolved DNA switching“

Das neue und unabhängige „time-resolved DNA switching“ System wurde eingesetzt, um die mögliche Interaktion zwischen den drei Fra a 1 Isoformen und FaAP zu analysieren (Langer, Hampel et al. 2013). Doppelsträngige DNA (48-x) wurde auf einem Biochip immobilisiert und die DNA-Orientierungen wurden in Echtzeit durch Fluoreszenz-Energietransfer des Cy3 Farbstoffes gemessen. Dieser Fluoreszenzfarbstoff war kovalent an das distale Ende der DNA angehängt (Abbildung 15). Durch zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung wurde die Auf- und Abwärtsbewegung der DNA überwacht.

Diese Bewegung erfolgte in kürzester Zeit (μs) durch sich jeweils ändernde Spannungen am Biochip. Ein Fluoreszenzhistogramm konnte somit innerhalb von Sekunden aufgenommen werden. Als eine Positivkontrolle wurde zunächst die Wechselwirkung des polyklonalen Antikörpers Anti-Fra a 1.02 mit den drei Fra a1 Isoformen, die an die 48-x-DNA gebunden waren, analysiert. Die DNA Auf- bzw. Abwärtsbewegung (Hebelbewegung) verlangsamte sich leicht, als die Allergene Fra a 1.02 und Fra a 1.03 an die DNA angehängt wurden, jedoch kaum bei der Konjugation mit Fra a 1.01E (Abbildung 30).

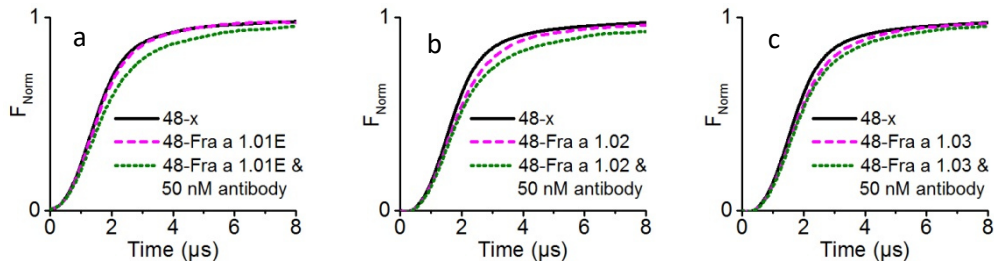


Abbildung 30 Zeitlich aufgelöste Fluoreszenzhistogramme für unmodifizierte DNA in Puffer (48-x, schwarze Linie); 48-x-Fra a 1.01E/1.02/1.03-DNA-Konjugate (magenta gestrichelte Linie); Fra 1.01E/1.02/1.03-48-x Konjugate nach Überspülen mit einer Lösung von 50 nM polyklonalen Anti-Fra 1.02 Antikörper über den Sensor und die Bildung von 48-x-Fra a 1-Anti-Fra a 1.02 Komplexen (grün gepunktete Linie). Achsenbeschriftung: Y-Achse: normalisierte Fluoreszenz; X-Achse: Zeit in μs .

Die Bewegung der DNA verlangsamte sich weiterhin deutlich in Gegenwart des Antikörpers Anti-Fra a 1.02 (50 nM). Dies ist durch die abnehmende Steigung der Fluoreszenzkurven bei Zugabe des Bindungspartners deutlich zu erkennen und weist auf eine Wechselwirkung der beiden Interaktionspartner hin (Abbildung 30). Aus den unterschiedlichen Steigungen kann geschlossen werden, dass Fra a 1.02 die höchste und schnellste Interaktion mit dem Antikörper aufweist, während Fra a 1.03 eine geringere Affinität zu dem polyklonalen Antikörper zeigte. Im Falle von Fra a 1.01E verlangsamte sich die Bewegung der DNA in Anwesenheit des Antikörpers, doch die Kurven für unmodifizierte DNA und das Fra a 1.01E-DNA Konjugat wiesen fast identische Steigungen auf, wodurch das Ergebnis für Fra a 1.01E nicht aussagekräftig bzw. nicht eindeutig war. Die zeitlichen Verläufe konnten gut in eine exponentielle Funktion eingepasst werden, welche für eine, auf die Reaktion limitierte Assoziationskinetik spricht. Die relative Fläche unter der Kurve (AUC) ist ein Parameter, welcher die Schnelligkeit der DNA-Bewegung misst, womit k_{on} (Geschwindigkeitskonstante der Assoziation) berechnet werden kann (Langer, Hampel et al. 2013). Da für Fra a 1.02 und Fra a 1.03 keine Dissoziation beobachtet wurde, konnte nur das k_{on} mit $1,9 \pm 0,5$ bzw. $0,6 \pm 0,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden (Tabelle 28).

Als zweite Positivkontrolle wurde die bekannte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen RCAR8 (UniProt #Q9FLB1), einem Bet v 1-homologen Protein, und ABI2 (GenBank Accession Number

Tabelle 28 Kinetische Daten für die Assoziation (k_{on}) zwischen dem Anti-Fra a 1.02 Antikörper und zwei Fra a 1 Isoformen. Es konnten keine kinetischen Daten für die Assoziation (k_{on}) zwischen dem Anti-Fra a 1.02 Antikörper und Fra a 1.01E ermittelt werden.

	$k_{on} (10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$
Fra a 1.02 Antikörper – Fra a 1.02	$1,9 \pm 0,5$
Fra a 1.02 Antikörper – Fra a 1.03	$0,6 \pm 0,2$

Y08965.1) in Gegenwart von Abscisinsäure (ABA) untersucht (Raghavendra, Gonugunta et al. 2010). RCAR8 ist eine Regulatorische Komponente des ABA Rezeptors β und es wurde bereits gezeigt, dass RCAR8 ABA-abhängig mit ABI2 (Abscisinsäure Insensitive 2) wechselwirkt. ABI2 ist eine PP2C Phosphatase (Proteinphosphatase Typ 2C) (Santiago, Rodrigues et al. 2009, Raghavendra, Gonugunta et al. 2010). Nach der Bindung von ABI2 (50 nM) an NTA₃-DNA wurde eine Mischung von RCAR8 (100 nM) und ABA (10 μM) über den Sensor gespült. Es wurde eine deutlich verschobene Fluoreszenzreaktionskurve beobachtet, die auf einen ABI2-ABA-RCAR8-Komplex hinweist (Abbildung 31). Der ABI2-ABA-RCAR8-Komplex weist eine k_{on} von $3,2 \pm 0,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und einen K_D von $1,9 \text{ nM} \pm 0,5$

auf (Tabelle 29). Nach der Bindung von ABI2 (50 nM) an NTA₃-DNA wurde RCAR8 (100 nM) über den Sensor gespült und bildete auch in Abwesenheit von ABA einen Komplex mit dem immobilisierten ABI2 (Abbildung 31). Danach wurde eine Lösung von ABI2 (50 nM), RCAR8 (100 nM) und ABA (10 µM) über den Biochip gegeben und die Fluoreszenzreaktionskurve blieb unverändert. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen ABI2 und RCAR8 ABA-unabhängig ist.

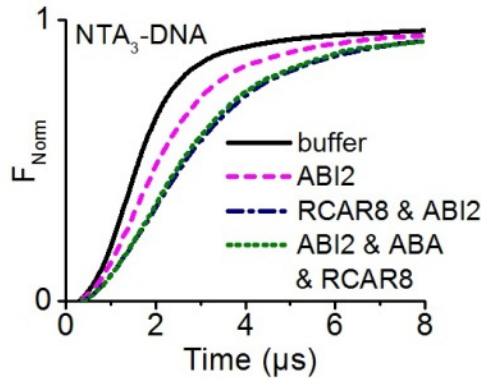


Abbildung 31 Zeitlich aufgelöstes Fluoreszenzhistogramm für das ABI2-NTA₃-modifizierte DNA-Konjugat (50 nM; magenta gestrichelte Linie); RCAR8 (100 nM) bildet einen Komplex mit dem immobilisierten ABI2 auch in Abwesenheit von ABA (blaue Strichpunkt-Linie); das Überströmen mit einer Lösung von ABI2 (50 nM), RCAR8 (100 nM) und ABA (10 µM) über die NTA₃-modifizierten DNA-Stränge auf dem Sensor führt zu keiner weiteren Verschiebung der zeitlich aufgelösten Kurve (grün gepunktete Linie). Achsenbeschriftung: Y-Achse: normalisierte Fluoreszenz; X-Achse: Zeit in µs.

Tabelle 29 Kinetische Daten ermittelt durch das „time-resolved DNA switching“ System für die Interaktion der Positivkontrolle ABI2, RCAR8 und ABA.

	k_{on} ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_{D} (nM)
ABI2 – RCAR8 – ABA	$3,2 \cdot 10^5 \pm 0,8$	$6,0 \cdot 10^{-4} \pm 1,0$	$1,9 \pm 0,5$

Um eine mögliche Wechselwirkung von Fra a 1 Proteinen mit FaAP nachzuweisen, wurden anschließend die mit der 48x-DNA konjugierten und am Biochip gebundenen Fra a 1 Isoformen mit 200 nM und 500 nM FaAP-eGFP Protein überspült. FaAP wurde als das Fusionsprotein mit eGFP (FaAP-eGFP; I.2.4.3) exprimiert und in den Experimenten verwendet, da unmodifiziertes FaAP kaum von *E. coli* exprimiert wurde. Wenn die Interaktionen zwischen Fra a 1.01E, Fra a 1.02 und Fra a 1.03 in Kombination mit FaAP-eGFP untersucht wurden, verlangsamte sich die Bewegung der DNA-Protein-Protein-Komplexe deutlich (Abbildung 32, grün gepunktete Linie).

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die drei Fra a 1 Isoformen offensichtlich mit FaAP-eGFP interagieren. Das Protein eGFP selbst zeigte keine Wechselwirkung mit den Isoformen Fra a 1.01E und Fra a 1.02, da die Fluoreszenzhistogramme in Gegenwart und Abwesenheit von eGFP identisch waren (Abbildung 33).

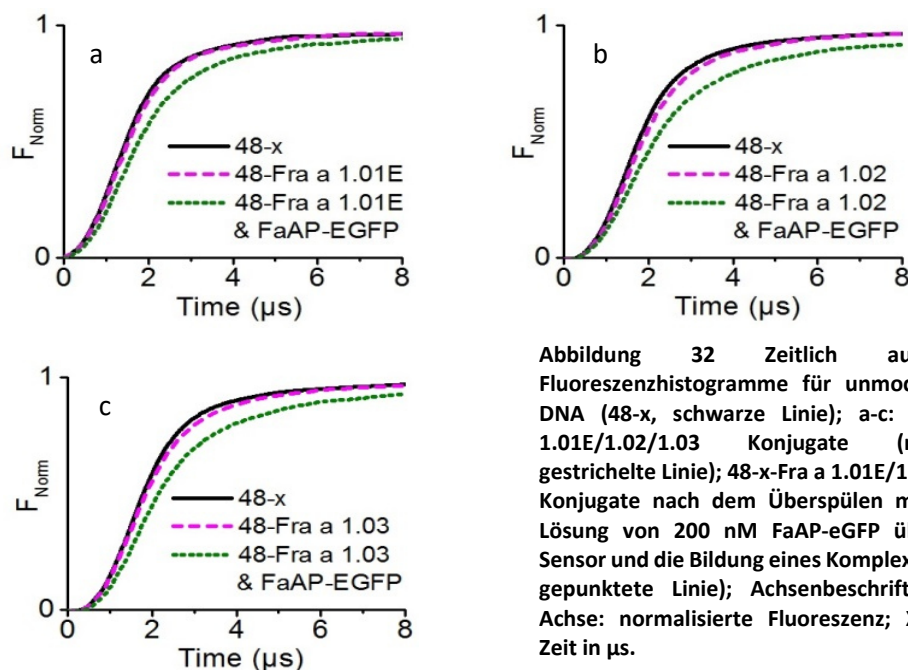


Abbildung 32 Zeitlich aufgelöste Fluoreszenzhistogramme für unmodifizierte DNA (48-x, schwarze Linie); a-c: 48-x-Fra a 1.01E/1.02/1.03 Konjugate (magenta gestrichelte Linie); 48-x-Fra a 1.01E/1.02/1.03 Konjugate nach dem Überspülen mit einer Lösung von 200 nM FaAP-eGFP über den Sensor und die Bildung eines Komplexes (grün gepunktete Linie); Achsenbeschriftung: Y-Achse: normalisierte Fluoreszenz; X-Achse: Zeit in µs.

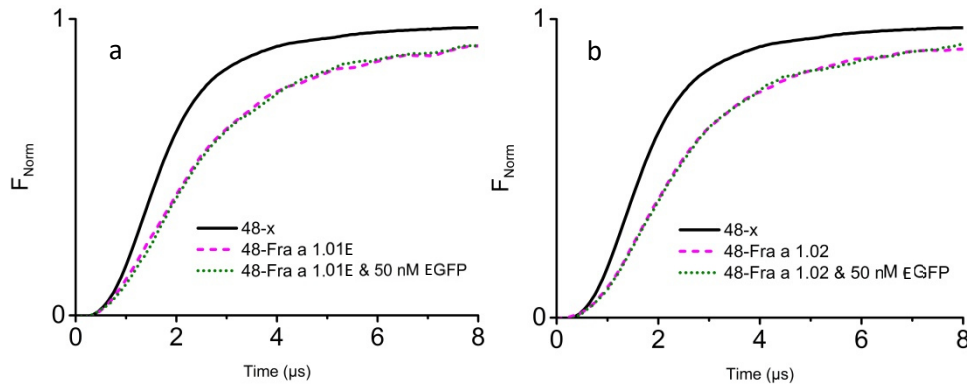


Abbildung 33 Zeitlich aufgelöste Fluoreszenzhistogramme für unmodifizierte DNA in Puffer (48-x, schwarze Linie); keine Wechselwirkung zwischen Fra a 1.01E/1.02 (violett gestrichelte Linie) und eGFP (50 nM; grün gepunktete Linie). Achsenbeschriftung: Y-Achse: normalisierte Fluoreszenz; X-Achse: Zeit in μs .

Die Bindungskinetik wurde unter Verwendung der gemessenen k_{on} und k_{off} Werte berechnet (Tabelle 30). Es zeigte sich, dass Fra a 1.01E langsam, aber sehr stark an FaAP-eGFP bindet (K_D von 4,5 nM). Die Bindungen von Fra a 1.02 und Fra a 1.03 an FaAP-eGFP wiesen nahezu identische Bindungskinetiken auf (K_D von 15 bzw. 11 nM).

Um den hydrodynamischen Durchmesser der Komplexe zu berechnen, wurden die drei Fra a 1 Isoformen und FaAP-eGFP mit ihrer His-tag Markierung an NTA₃-DNA gebunden. Eine Proteinkonzentration von 200 nM wurde verwendet, um alle NTA₃-Chelatorköpfe mit His-tag markierten Protein zu sättigen. FaAP-eGFP bildete jeweils einen Komplex mit Fra a 1.01E, Fra a 1.02 und Fra a 1.03, da die Steigungen der Fluoreszenzkurven in Gegenwart von FaAP-eGFP immer am geringsten waren (Abbildung 34).

Tabelle 30 Kinetische Daten ermittelt durch das „time-resolved DNA switching“ System für die Interaktionen zwischen FaAP-eGFP und den drei Fra a 1 Isoformen.

	k_{on} ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)
FaAP-eGFP – Fra a 1.01E	$5,8 * 10^3 \pm 0,4$	$2,6 * 10^{-5} \pm 0,6$	$4,5 \pm 1,1$
FaAP-eGFP – Fra a 1.02	$1,2 * 10^5 \pm 0,1$	$0,0017 \pm 0,0002$	15 ± 3
FaAP-eGFP – Fra a 1.03	$1,2 * 10^5 \pm 0,1$	$0,0013 \pm 0,0002$	11 ± 2

Im Fall von FaAP-eGFP und Fra a 1.01E verlangsamte sich die Auf- und Abwärtsbewegung des DNA-Protein-Protein-Komplexes stärker als bei der Interaktion von FaAP-eGFP mit Fra a 1.02 und Fra a 1.03. Auch die Steigung der Fluoreszenzkurven von Fra a 1.01E und FaAP-eGFP sind sehr ähnlich ganz im Gegenteil zu Fra a 1.02 und Fra a 1.03 (Abbildung 34). Dies deutet darauf hin, dass Fra a 1.01E

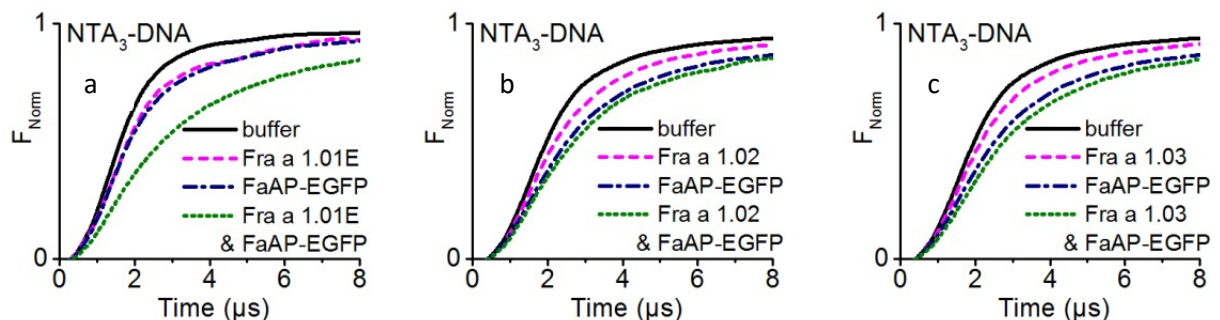


Abbildung 34 Zeitlich aufgelöste Fluoreszenzhistogramme für NTA₃-DNA nach Ni-Beladung in Puffer (schwarze Linie); Fra a 1.01E/1.02/1.03-NTA₃-DNA Konjugate (magenta gestrichelte Linie); FaAP-eGFP-NTA₃-DNA Konjugat (blaue Strich-Punkt-Linie); Mischung von Fra a 1.01E/1.02/1.03 und FaAP-eGFP-NTA₃-DNA Konjugaten (grün gepunktete Linie). Achsenbeschriftung: Y-Achse: normalisierte Fluoreszenz; X-Achse: Zeit in μs .

wahrscheinlich als Dimer an FaAP-eGFP bindet. Bei der Interaktionsstudie von Fra a 1.01E konnten zwei Zeitkonstanten gemessen werden. Eine schnelle Bindung für die Interaktion von Fra a 1.01E an die NTA₃-DNA-His-tag Markierung ($\sim 0,02 \text{ s}^{-1}$) und eine langsame, aber starke Wechselwirkung zwischen Fra a 1.01E und FaAP-eGFP ($\sim 0,003 \text{ s}^{-1}$) wie oben bereits beschrieben.

Für die weitere Untersuchung der unterschiedlichen Bindungseigenschaften wurden die hydrodynamischen Proteindurchmesser der NTA₃-DNA-His-tag gebundenen Proteine unter Verwendung des Lollipop-Modells bestimmt (Langer, Hampel et al. 2013). Fra a 1.01E zeigte eine deutlich größere Verschiebung der Fluoreszenzkurve (Abbildung 35) und folglich einen höheren hydrodynamischen Proteindurchmesser von 5,5 nm im Vergleich zu Fra a 1.02 und Fra a 1.03 mit 4,6 nm bzw. 4,2 nm (Tabelle 31).

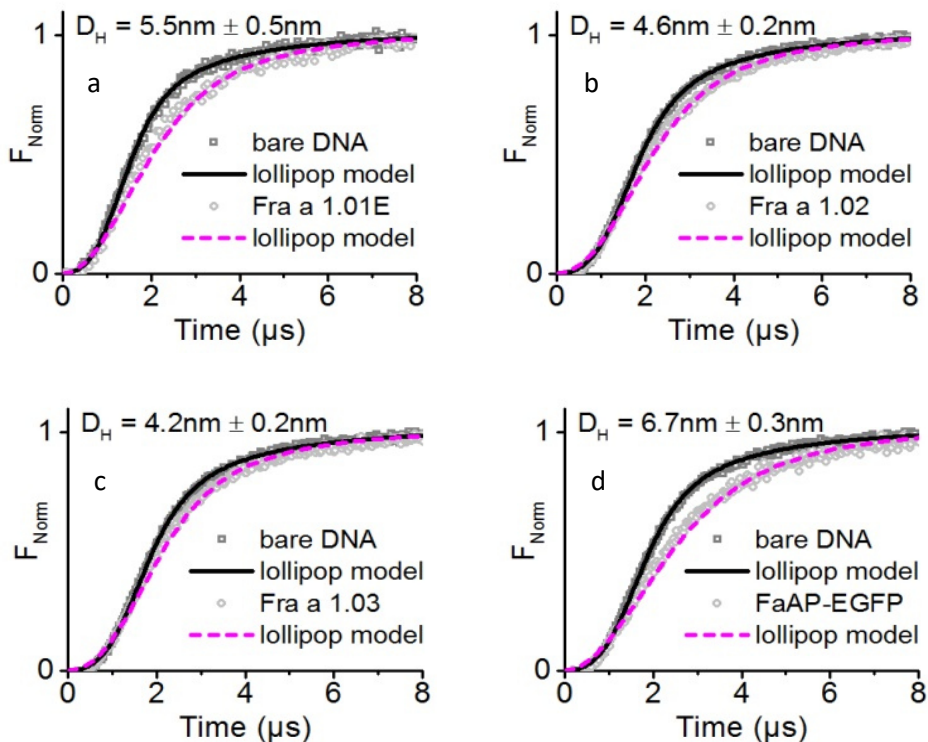


Abbildung 35 Zeitlich aufgelöste Fluoreszenzhistogramme für NTA₃-DNA nach Ni-Beladung in Puffer (schwarze Linie); a-c: Fra a 1.01E/1.02/1.03-NTA₃-DNA Konjugate und (d) FaAP-eGFP-NTA₃-DNA Konjugat (magenta gestrichelte Linie). Achsenbeschriftung: Y-Achse: normalisierte Fluoreszenz; X-Achse: Zeit in µs.

Tabelle 31 Hydrodynamischer Durchmesser von Fra a 1.01E/1.02/1.03 und FaAP-eGFP, gemessen mittels Lollipop-Modell (Langer et al. 2013).

	Masse (g/mol)	Hydrodynamischer Durchmesser
Fra a 1.01E	18696	5,5 ± 0,5
Fra a 1.02	18428	4,6 ± 0,2
Fra a 1.03	18378	4,2 ± 0,2
FaAP-eGFP	48384	6,7 ± 0,3

Dieses Resultat gibt Grund zu der Annahme einer FaAP-unabhängigen Dimerbildung von Fra a 1.01E, welches über den His-tag an die NTA₃-DNA gebunden ist. Ein weiteres Indiz für die Hypothese der Dimerbildung von Fra a 1.01E ist die deutlich geringere Steigung der Fluoreszenzkurve bei der Interaktion von Fra a 1.01E und FaAP-eGFP im Vergleich zu der deutlich steileren Steigung der Fluoreszenzkurve von Fra a 1.02 bzw. Fra a 1.03 mit FaAP-eGFP (Abbildung 34). Dies impliziert, dass Fra a 1.01E als Dimer mit FaAP-eGFP interagiert. Die hydrodynamischen Durchmesser von Fra a 1.02 und Fra a 1.03 entsprechen ihren ähnlichen Molekülmassen. FaAP-eGFP zeigt ebenfalls einen

entsprechenden hydrodynamischen Durchmesser für die Molekülmasse des Fusionsproteins (Tabelle 31) (Langer, Hampel et al. 2013). Auch das Trennmuster von rFra a 1.01E in einem Nativen Polyacrylamidgel liefert einen weiteren Hinweis für die Dimerisierung oder sogar die Bildung von Tetrameren von Fra a 1.01E. Auf dem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel wurde das rekombinante Protein Fra a 1.01E in nativer Form aufgetragen, aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue G250 gefärbt bzw. im Western Blot mit dem polyklonalen Anti-Fra a 1.02 Antikörper visualisiert (Abbildung 36). Die Bildung von Dimeren (36 kDa) oder Tetrameren (72 kDa) ist basierend auf der eingesetzten Proteinkonzentration von 10 µg bis 50 µg im Western Blot deutlich als konzentrationsabhängig zu erkennen. Ein weiterer interessanter Punkt ist die Bildung von Fra a 1.01E Oligomeren in Abwesenheit von FaAP. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die Oligomerisierung von Fra a 1.01E konzentrationsabhängig und FaAP-unabhängig ist.

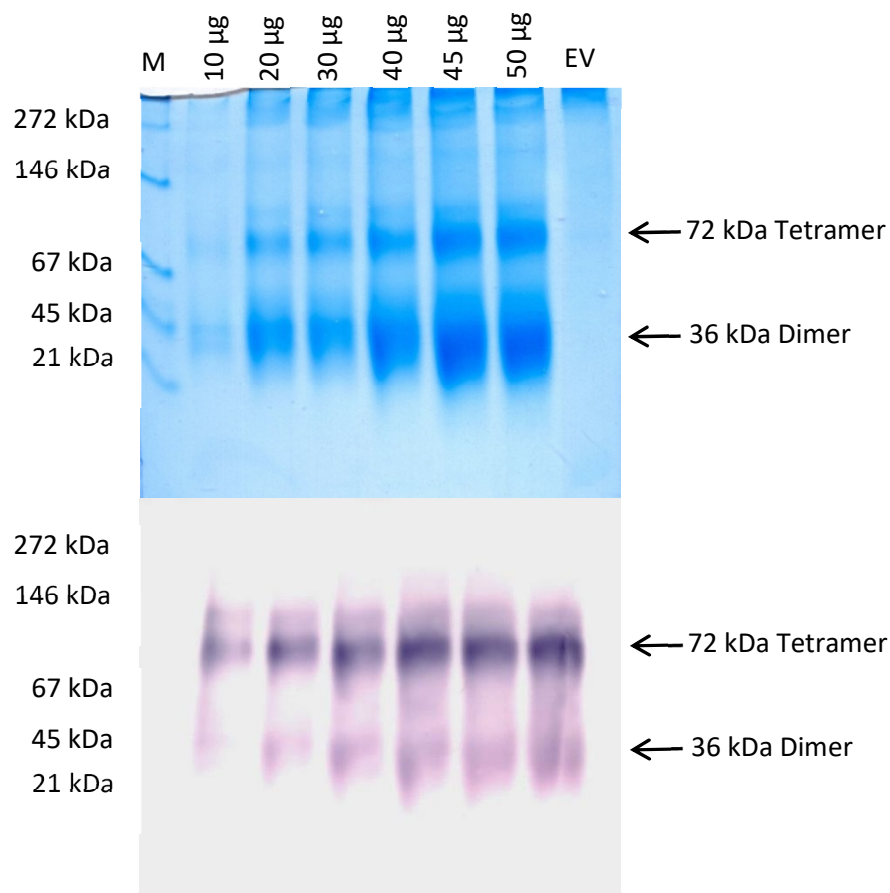


Abbildung 36 Nicht-denaturiertes Polyacrylamidgel und Western Blot Analyse des nativen rekombinanten Fra a 1.01E Proteins in unterschiedlichen Konzentrationen (10 - 50 µg). Das nicht-denaturierte Polyacrylamidgel wurde mittels Coomassie Färbung visualisiert. Der Western Blot wurde mit dem polyklonalen Anti-Fra a 1.02 Antikörper detektiert. M: Proteinmarker Native Marker Liquid Mix for BN/CN (Abbildung 16 c; Proteingröße in kDa); eingesetzte Proteinkonzentrationen (10, 20, 30, 40, 45 und 50 µg) und 10 µg pQE70 Leervektor (EV).

Als Negativkontrollen wurde die Bindung von FaAP-eGFP, Fra a 1.01E, Fra a 1.02, Fra a 1.03, Anti-Fra a 1.02 Antikörper, RCAR8 und RCAR8 in Gegenwart von ABI2 an unmodifizierte 48-x DNA gebunden analysiert (Abbildung 37). Eine Wechselwirkung wurde nicht beobachtet. Nur FaAP-eGFP bei einer Konzentration von 500 nM und RCAR8-ABI2 zeigten eine geringe unspezifische Bindung an die unmodifizierte 48-x DNA.

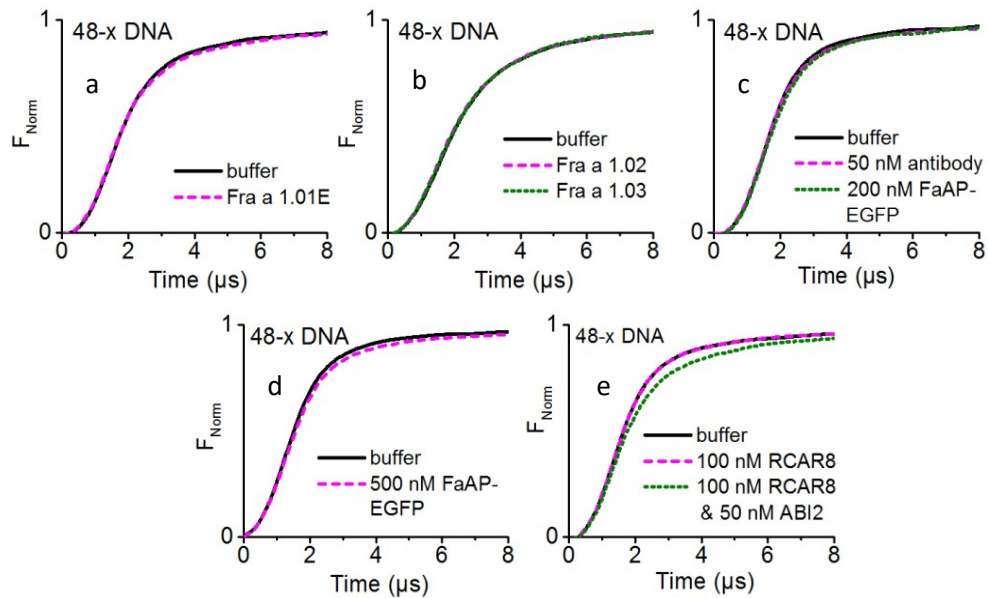


Abbildung 37 Zeitlich aufgelöste Fluoreszenzhistogramme für unmodifizierte DNA im Puffer (48-x, schwarze Linie). a-c: Keine Wechselwirkung zwischen Fra a 1.01 E/1.02 (200 nM; magenta gestrichelte Linie), Fra a 1.03 (200 nM; grün gepunktete Linie), polyklonaler Anti-Fra a 1.02 Antikörper (50 nM (magenta gestrichelte Linie), FaAP-eGFP (200 nM; grün gepunktete Linie) und unmodifizierter 48-x-DNA; d: geringfügige nicht-spezifische Bindung von FaAP-eGFP (500 nM; magenta gestrichelte Linie) an unmodifizierte 48-x-DNA; e: keine Wechselwirkung zwischen RCAR8 (100 nM; magenta gestrichelte Linie) und unmodifizierter 48-x-DNA, geringfügige nicht-spezifische Wechselwirkung von ABI2-RCAR8 (50 nM / 100 nM; grün gepunktete Linie) mit unmodifizierter 48-x-DNA. Achsenbeschriftung: Y-Achse: normalisierte Fluoreszenz; X-Achse: Zeit in μ s.

IV Diskussion

1. Basophilen Aktivierungstest

1.1 Einordnung des Erdbeerallergens Fra a 1

Birkenpollenallergiker in Mittel- und Nordeuropa zeigen häufig auch allergische Reaktionen gegenüber weiteren Früchten der Familie der Rosaceae. Diese allergischen Reaktionen basieren offensichtlich auf der Anwesenheit von kreuzreaktiven Allergenen (Vieths, Scheurer et al. 2002, Hauser, Roulias et al. 2010). Strukturell homologe Proteine des wichtigsten Birkenpollenallergens Bet v 1, die auch der PR-10 Proteinfamilie zugerechnet werden wurden zum Beispiel aus Apfel (Mal d 1) und der Erdbeerfrucht (Fra a 1) isoliert (Rodriguez, Crespo et al. 2000, Laimer and Maghuly 2010). Auch in dieser Studie zeigten vier bzw. sechs von acht atopischen Probanden, die gegen Birkenpollen allergisch waren, eine positive Skin-Prick-Test Reaktion gegenüber phenolischen Erdbeerfruchtextrakten aus den kultivierten Genotypen *F. xananassa* cv. Mara des Bois bzw. cv. Elsanta. Die Quaddel- und Flare-Bildungen waren jedoch geringer ausgeprägt, wenn ein phenolischer Extrakt aus der Walderdbeere *F. vesca* eingesetzt wurde (II.1.3, Tabelle 4, Tabelle 5). Bet v 1 homologe Proteine sind im Pflanzenreich ubiquitär zu finden und werden als Panallergene bezeichnet (Karlsson, Alm et al. 2004, Marzban, Puehringer et al. 2005). Die bei Birkenpollenallergikern beobachteten Reaktionen auf Nahrung werden hauptsächlich durch IgE-Antikörper gegen Bet v 1 erklärt, die durch Birkenpollen induziert werden. Diese Antikörper können mit Bet v 1-homologen Proteinen in verschiedenen pflanzlichen Nahrungsmitteln kreuzreagieren. In den Birken-reichen Gebieten Nord- und Mitteleuropas ist ein hoher Prozentsatz von Birkenpollenallergikern gegen Bet v 1 sensibilisiert. Die meisten Allergiker haben Bet v 1-IgE-Antikörper als einzige Spezifität (Hauser, Roulias et al. 2010). Die Bet v 1-homologen Proteine sind gleichmäßig im Fruchtfleisch der Früchte verteilt (Erdmann, Sachs et al. 2005), wie in dieser Studie für Erdbeerfrüchte verschiedener Sorten und auch Reifestadien gezeigt wurde (Abbildung 27). Auch für das homologe Haupt-Apfelallergen Mal d 1 wurde mittels ITP bereits gezeigt, dass Mal d 1 über das gesamte Apfelfruchtfleisch und die Schale verteilt ist (Marzban, Puehringer et al. 2005) und der Gehalt von Mal d 1 während der Reifung kontinuierlich ansteigt (Szamos, Takacs et al. 2011). In Birken-armen Gebieten wie z. B. in Südeuropa, stellen die allergischen Reaktionen auf Birkenpollen häufig eine Sensibilisierung gegenüber anderen Pollenallergenfamilien wie den Profilinen (Bet v 2 Homologe; Fra a 4) in Gras und Unkräutern dar (Vieths, Scheurer et al. 2002).

1.2 Allergenes Potential der acht Fra a 1 Isoformen

Acht Bet v 1-homologe Fra a 1 Proteine der PR-10 Proteinfamilie, deren Gene im Genom der Walderdbeere *F. vesca* identifiziert wurden, wurden analysiert (Shulaev, Sargent et al. 2011). Die acht *Fra a 1* Gene werden im Fruchtfleisch reifer Früchte exprimiert, welches in frischer oder verarbeiteter Form verzehrt wird (Kang, Darwish et al. 2013). Obwohl Fra a 1.01E als das Haupt-Erdbeerallergen bezeichnet wurde (Karlsson, Alm et al. 2004, Hjernø, Alm et al. 2006, Musidlowska-Persson, Alm et al. 2007), zeigten die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen signifikant höhere Transkriptlevel von Fra a 1.02 im Fruchtfleisch von roten reifen Erdbeerfrüchten (*F. xananassa*) im Vergleich zu Fra a 1.01E und Fra a 1.03 (Abbildung 12, Abbildung 23). Fra a 1.03 kodiert für eine weitere allergene Isoform neben Fra a 1.02.

Die acht Fra a 1 Proteine weisen untereinander hohe Sequenzähnlichkeiten von 74,5% bis 97,5% mit Fra a 1.02 und von 54% bis 59,6% mit Bet v 1a auf (Tabelle 3, Tabelle 24, Abbildung 11). Dennoch unterschied sich die Aktivierung von basophilen Granulozyten der Birkenpollenallergiker wesentlich zwischen den Isoformen. Fra a 1.01E und Fra a 1.04-1.08 zeigten ein geringes Potential zur Aktivierung von Basophilen, dies liegt vermutlich an einer reduzierten IgE-Bindung (Erdmann, Sachs et al. 2005). Unterschiede in der IgE-Bindungsaktivität sind, trotz der hohen Sequenzähnlichkeit der Proteine, ein gemeinsames Merkmal innerhalb der PR-10 Proteinfamilie. Einige der strukturell eng verwandten Proteine sind potente Allergene, während andere weniger allergen sind oder gar kein allergenes Potential aufweisen. Kürzlich durchgeführte Kristallstrukturanalysen von Bet v 1 Varianten im Komplex mit zahlreichen Liganden identifizierten Phe31 (Abbildung 11) als wichtige Aminosäure, die Bet v 1

Isoformen, welche eine hohe bzw. niedrige IgE-bindende Fähigkeit aufweisen, unterscheidet. Dies induziert auch eine drastische Änderung der Bindungsart des Modellliganden Desoxycholat. Phe31 in Bet v 1 Isoformen beeinflusst somit direkt die Topologie der hydrophoben Höhle (Kofler, Asam et al. 2012). Sowohl die allergenen als auch die hypoallergenen Isoformen von Fra a 1 weisen an dieser Position jedoch Isoleucin auf. Dies impliziert, dass diese Beobachtung auf die Bet v 1 Isoformen beschränkt ist (Abbildung 11).

Es bestehen bemerkenswert hohe Sequenzähnlichkeiten zwischen Fra a 1.02 und Fra a 1.04, Fra a 1.06 und Fra a 1.05 mit Werten von 95,7%, 96,3% und 97,5%. Die Proteine unterscheiden sich jeweils nur in sechs, fünf bzw. drei Aminosäuren (Tabelle 3, Abbildung 11). Zwei Aminosäureaustausche bei Ile87Val und Ser107Ala sind in Fra a 1.04, Fra a 1.05 und Fra a 1.06 im Vergleich zu Fra a 1.02 vorhanden. Die Aminosäuren scheinen für die IgE-Bindung wichtig zu sein, da nur Fra 1.02 und Fra a 1.03 potente Allergene sind und es sich bei Fra a 1.04 und Fra a 1.05 um hypoallergene und bei Fra a 1.06 um eine mäßig allergene Isoform handelt. Zusätzlich weisen Fra a 1.04 und 1.06 einen dritten Aminosäureaustausch von Glu78Asp auf und auch Fra a 1.04 und 1.06 haben die Aminosäureaustausche von Ile114Val und Gly150Asp im Vergleich zu Fra a 1.02 gemeinsam. Es wird angenommen, dass Allergene mindestens zwei verschiedenartige und räumlich getrennte Antikörperbindende Epitope aufweisen müssen, um IgE-Komplexe zu aggregieren, als Allergene zu wirken und Basophile zu aktivieren (Mirza, Henriksen et al. 2000, Gieras, Cejka et al. 2011). Kürzlich wurden Antikörper gegen Bet v 1 Peptide erzeugt und eingesetzt, um mit humanen IgEs um die Bindung an Bet v 1 zu konkurrieren. Zwei Peptide, die die Aminosäuren 30-59 (P2) und die Aminosäuren 74-104 (P6) der Bet v 1 Sequenz umfassen, hemmten stark die Bindung des IgE der Patienten an Bet v 1 (Gieras, Cejka et al. 2011). Es wurde vermutet, dass P2 und P6 ein Oberflächenmerkmal auf dem Bet v 1 Allergen definieren, welches für eine effiziente Basophilenaktivierung erforderlich ist. Da das allergene Fra a 1.02 und die hypoallergenen Isoformen Fra a 1.04 und Fra a 1.05 identische P2 Sequenzen aufweisen, kann diese mutmaßliche Bindungsstelle die gegensätzliche immunologische Wirkung der Isoformen nicht erklären. Die beiden Aminosäureaustausche Ile87Val und Glu78Asp, die Fra a 1.02 von Fra a 1.04 und Fra a 1.05 unterscheiden, sind jedoch im P6 Motiv lokalisiert. Deshalb werden mehrfache Bindungsepitope für die Fra a 1 Proteine vermutet, da es keine einzelnen Aminosäureaustausche gibt, die alle hypoallergenen von den allergenen Isoformen deutlich unterscheiden. Somit könnten die Vergleiche des IgE-Peptide Mappings und Strukturanalysen der rekombinanten Fra a 1 Proteine in zukünftigen Studien nützlich sein, um die Bindung von IgE an die Erdbeerproteine aufzudecken und die Kreuzreaktivität zu erklären.

1.3 Identifikation des Haupt-Erdbeerallergens

Die Transkripthäufigkeit von Fra a 1.02, Fra a 1.03 (kodierend für allergene Proteine) und Fra a 1.01E (kodierend für das vorgeschlagene Haupt-Erdbeerallergen) (Musidlowaska-Persson, Alm et al. 2007) wurde in reifen Erdbeerfrüchten der Genotypen *F. vesca* rot-fruchtiger WT, cv. Yellow Wonder, *F. xananassa* cv. Elsanta und cv. Mara des Bois untersucht. Da das für Fra a 1.02 kodierende Gen in Früchten, in welchen ein hohes allergenes Potential nachgewiesen werden konnte, sehr stark exprimiert wird (Abbildung 23), wurde Fra a 1.02 eindeutig als das prominente Bet v 1-homologe Allergen in *F. xananassa* cv. Elsanta und cv. Mara des Bois identifiziert. Beide Kultivare zeigten die höchsten Stimulationswerte im SPT (II.1.3). Fra a 1.01E und Fra a 1.03 wurden im Fruchtfleisch der Kultivare mit hohem allergenen Potential nur schwach exprimiert. Fra a 1.01E wird in der Wurzel stark exprimiert und Fra a 1.03 in offenen Blüten, ihre relativen Expressionslevel sind prinzipiell niedrig. Des Weiteren konnte in einem Experiment zur RNAi-vermittelten Herabregulierung nachgewiesen werden, dass die Herunterregulation von *FaCHS* auch eine parallele Herunterregulation der Expression von Fra a 1E und Fra a 3 nach sich zieht. Die Reife-induzierte Expression Fra a 2 war hiervon, trotz hoher Sequenzhomologien, nicht betroffen. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die einzelnen Isoformen unterschiedliche Funktionen ausüben (Muñoz, Hoffmann et al. 2010).

Die dargelegten Ergebnisse demonstrieren deutlich, dass kleine Veränderungen in der Aminosäuresequenz die allergenen Eigenschaften von paralogen Proteinen signifikant verändern können, obwohl ihre dreidimensionalen Strukturen nahezu identisch sind. Die Daten bestätigen

Fra a 1.02, dessen Genexpression von der Reifung der Erdbeerfrucht abhängig ist, als das Haupt-Bet v 1-homologe Allergen in der Erdbeerfrucht. Die Daten sind essenziell für die Züchtung von hypoallergenen Erdbeersorten mit Fra a 1.02 als Marker.

1.4 Allergenes Potential der verschiedenen Erdbeergenotypen

Zur Identifizierung von allergenarmen Erdbeerkultivaren wurden 51 Genotypen einer phenolischen Proteinextraktion unterzogen, anschließend mittels Western Blot untersucht und mit dem polyklonalen Anti-Fra a 1.02 Antikörper visualisiert. Drei klare Banden bei etwa 15 kDa, 18 kDa und 20 kDa wurden durch den Antikörper detektiert (Abbildung 24). Das Auftreten der Fra a 1 Proteine in zwei deutlich getrennten Banden kann durch posttranslationale Modifikationen, Spleißvarianten oder allelische Versionen der Erdbeerproteine erklärt werden. Die octaploiden *F. ×ananassa* Kultivare exprimieren bis zu 8 Allele eines *Fra a 1* Genes (Hjernø, Alm et al. 2006). Diese Proteine können jedoch nicht in allen Genotypen, abhängig von der Konzentration der Fra a 1 Proteine, eindeutig aufgetrennt werden (Abbildung 24). Die dritte Bande enthielt ein Protein, welches für Calmodulin-2/3/5 (gene 10223) (Shulaev, Sargent et al. 2011) kodiert. Die Detektion des Calmodulin-2/3/5 durch den polyklonalen Anti-Fra a 1.02 Antikörper deutet daraufhin, dass Calmodulin-2/3/5 und Fra a 1 einen sehr ähnlichen Teil der Proteinsequenz aufweisen oder einen sehr ähnlichen Teil der Tertiärstruktur besitzen, welche als Epitope für den polyklonalen Anti-Fra a 1.02 Antikörper dienen können.

Elf weiß-fruchtige Erdbeergenotypen wurden aufgrund der schwachen Ausprägung der Proteinbanden bei 18 kDa und 20 kDa basierend auf der geringen Expression der an dieser Position lokalisierten Fra a 1 Proteine in der Western Blot Analyse für weitere Analysen durch den Basophilen Aktivierungstest ausgewählt (Tabelle 27). *F. vesca* rot-fruchtiger Wildtyp und die *F. ×ananassa* Kultivare Elsanta und Mara des Bois dienten als Kontrollen. Trotz einer geringen Ausprägung der Proteinbanden der Fra a 1 Proteine in der Western Blot Analyse, wurde im Basophilen Aktivierungstest ein deutlich höheres allergenes Potenzial für Proteinextrakte aus weiß-fruchtigen *F. nilgerrensis* Genotypen, den *F. vesca* Kultivaren ('Hawaii 4' und '185') und *F. ×ananassa* 'P100693' (Abbildung 25) gemessen. Somit ist davon auszugehen, dass weiß-fruchtige Erdbeersorten nicht *per se* ein geringes allergenes Potential aufweisen und von Allergikern toleriert werden können, obwohl von einer hypoallergenen weiß-fruchtigen Erdbeersorte berichtet wurde (Hjernø, Alm et al. 2006).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine allergische Reaktion eines atopischen Individuums hochkomplex ist und dass bei der Auslösung einer allergischen Reaktion oft mehr als eine Proteinfamilie beteiligt ist. Neben Fra a 1, ein Mitglied der PR-10 Proteinfamilie, spielen auch Proteinfamilien wie Fra a 3 aus der pflanzlichen nsLTP1 Familie (unspezifisches Lipidtransferprotein), welches eine Untergruppe der PR-14 Proteinfamilie darstellt, und Fra a 4 (Profilin) eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen durch Erdbeerfruchtextrakte (Laimer and Maghuly 2010, Andersen, Hall et al. 2011). Das Panallergen Profilin, das Eurallergen nsLTP und PR-10 Proteine führen zu klinisch relevanten IgE-Kreuzreaktionen zwischen nicht verwandten Allergenquellen, die in Pollen, pflanzlicher Nahrung und verarbeiteten Produkten vorkommen (Hauser, Roulias et al. 2010). Des Weiteren wurde die Kreuzreaktivität zwischen den Proteinfamilien Bet v 1 (PR-10) und Bet v 2 (Birken Profilin) durch ein mittels des Profilin-spezifischen Antikörpers verursachte Kreuzinhibition beobachtet (Ebner, Hirschwehr et al. 1995). Das unerwartet hohe allergene Potential von Früchten der Arten *F. nilgerrensis* sowie einigen *F. vesca* und *F. ×ananassa* Kultivaren kann auch auf Proteine der Allergie-auslösenden Fra a 3 und Fra a 4 Proteinfamilien zurückgeführt werden. Andererseits ist es auch wichtig zu betonen, dass eine extensive IgE-Kreuzreaktivität zwischen PR-10 Proteinen, nsLTPs, Profilinen und weiteren nicht verwandten Proteinen durch kreuzreaktive Kohlenhydratdeterminanten (CCD) von Glykoproteinen verursacht werden könnte, welche weit über die evolutionäre Abstammungslinie verteilt sind (Bishop and Gagneux 2007, Macher and Galili 2008, Hauser, Roulias et al. 2010). Diese Faktoren könnten zu der hohen biologischen Variabilität der CD63+ Aktivierung der basophilen Granulozyten beitragen, wenn sie durch Erdbeerfruchtextrakte stimuliert werden (Abbildung 25). Insgesamt wies nur *F. vesca* cv. Yellow Wonder ein geringes allergenes Potential sowohl bei der Western Blot Analyse als auch beim basophilen Aktivierungstest auf und kann somit als hypoallergenes Erdbeerkultivar bezeichnet werden (Tabelle 26, Abbildung 25).

1.5 Analyse der relativen Genexpression der *Fra a 1* Gene in den Erdbeergenotypen

Die relativen Genexpressionslevel der Erdbeerfruchtallergene *Fra a 1.01E*, *Fra a 1.02* und *Fra a 1.03* wurden in Früchten von *F. vesca* rot-fruchtiger Wildtyp, *F. vesca* cv. Yellow Wonder und den *F. xananassa* Kultivaren Elsanta und Mara des Bois untersucht (IV.1.3, Abbildung 23). Das identifizierte Haupt-Erdbeerallergen *Fra a 1.02*, welches für das Protein mit dem höchsten allergenen Potential der 21 Isoformen des Bet v 1-homologen Allergens kodiert, zeigte in Früchten der *F. xananassa* Kultivare Elsanta und Mara des Bois um 110- bzw. 220-fach höhere Expressionslevel als in *F. vesca* rot-fruchtiger Wildtyp und *F. vesca* cv. Yellow Wonder. Das Ergebnis der geringen relativen Genexpression von *Fra a 1.02* mit einem Wert von 1,7 bestätigt die starke Vermutung, dass es sich bei *F. vesca* cv. Yellow Wonder um ein hypoallergenes Erdbeerkultivar handelt. Die Aktivierung von Basophilen durch phenolische Proteinextrakte aus verschiedenen Erdbeergenotypen scheinen gut mit dem Expressionslevel des *Fra a 1.02* Gens in den Früchten zu korrelieren.

1.6 Genmutationen bezüglich der Farbe einer reifen Erdbeerfrucht

In der Gattung *Fragaria* existieren sowohl rot- als auch gelb- und weiß-fruchtige Akzessionen. Hohe Konzentrationen von Anthocyanen sind nur in den roten reifen Früchten vorhanden, nicht jedoch in den gelben und weißen Erdbeerfrüchten (Urrutia, Schwab et al. 2016). Die Co-Segregation zwischen dem Anthocyanin-Biosynthesegen Flavanon 3-Hydroxylase (F3H) und dem Locus *c*, welcher vermutlich in diploiden Erdbeergenotypen für die gelbe Fruchtfarbe verantwortlich ist, wurde beobachtet und führte zu der Hypothese, dass *FaF3H* ein Kandidatengens für den Locus *c* sein könnte (Deng and Davis 2001). Für die Arten *F. xananassa* und *F. vesca* konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor FaMYB10 eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Akkumulation von rotem Pigment im fleischigen Fruchtboden spielt (Hawkins, Caruana et al. 2016), da die RNAi-Herunterregulation des Transkriptionsfaktors FaMYB10 zu einer signifikanten Reduktion von Anthocyanen im fleischigen Fruchtboden führte (Medina-Puche, Cumplido-Laso et al. 2013). In ähnlicher Weise führte die Herunterregulation der Gene für die Abscisinsäure-Biosynthese zu einer Frucht mit verminderter Anthocyan Akkumulation (Jia, Chai et al. 2011). In der weiß-fruchtigen Art *F. chiloensis* subsp. *chiloensis* scheint die Anthocyanidin-Glukosyltransferase mutiert zu sein. Diese Mutation führt zu einem reduzierten Gehalt an Anthocyanen in reifen Früchten (Griesser, Hoffmann et al. 2008a). Eine Transkriptomsequenzierung von *F. vesca* cv. Yellow Wonder zeigte, dass die Transkriptmengen einiger Anthocyan-Biosynthesegene und mehrerer MYB Gene in der Frucht von *F. vesca* cv. Yellow Wonder reduziert sind (Zhang, Li et al. 2015, Härtl, Denton et al. 2017). Es wurde bereits berichtet, dass Erdbeerallergiker auf die Früchte einer weiß-fruchtigen unbekanntes Erdbeerakzession keine klinischen allergischen Reaktionen zeigten, da die Früchte fast frei von dem Erdbeerallergen *Fra a 1* waren (Hjernø, Alm et al. 2006). Proteomanalysen ergaben, dass auch die Gehalte mehrerer Enzyme des Anthocyanbiosyntheseweges reduziert waren (Hjernø, Alm et al. 2006, Griesser, Hoffmann et al. 2008a, Muñoz, Hoffmann et al. 2010). Auch die RNAi-Herunterregulation von *Fra a 1* Genen in rot-fruchtigen *F. xananassa* cv. Elsanta Früchten führte zu einer beträchtlichen Reduktion der Anthocyanpigmente (Muñoz, Hoffmann et al. 2010). Diese Beispiele zeigen, dass Mutationen, die der Fruchtfarbe zugrunde liegen, vielfältig sind und zu der Schlussfolgerung führen, dass weiß-fruchtige Erdbeerfrüchte nicht zwingend frei von dem Erdbeerallergen *Fra a 1* sein müssen. Die Züchtung hypoallergener Kultivare unter Verwendung zum Beispiel von *F. vesca* cv. Yellow Wonder sollte ein wichtiges zukünftiges Ziel der Züchtung werden. Bisher konzentriert sich die Züchtung vor allem auf Ertrag, Geschmack und Geruch der Frucht, die Haltbarkeit bei der Lagerung und die nährwertbezogenen Merkmale (Mazzoni, Perez-Lopez et al. 2016).

Die Ergebnisse zeigen, dass Früchte von *F. vesca* cv. Yellow Wonder ein geringes allergenes Potential aufweisen und von Patienten mit leichter allergischer Ausprägung gegen Erdbeeren akzeptiert werden könnten. Diese Daten sind sehr wertvoll für die selektive Züchtung von weiteren hypoallergenen Erdbeersorten.

2. Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Fra a 1 und FaAP

2.1 *In vivo* Interaktionsanalyse mittels des Hefe Zwei-Hybrid Systems

Da FaAP durch die *in silico* Analyse als orthologes Protein von MdAP identifiziert wurde, wurde die mutmaßliche *in vivo* Wechselwirkung zwischen den drei Fra a 1 Isoformen und FaAP durch ein Hefe Zwei-Hybrid System (Y2H) untersucht. Allerdings wurde eine starke Autoaktivierung von FaAP, einem bekannten Nachteil des Y2H Systems, beobachtet (Abbildung 29). Die Autoaktivierung bezeichnet in diesem Fall eine nachweisbare „Köder“-abhängige Aktivierung des Reportergens (in diesem Fall HIS3) in Kombination mit einem leeren „Beute“-Vektor (Maier, Maier et al. 2012, Worseck, Grossmann et al. 2012). Um die Aktivierung des Reportergens durch FaAP zu reduzieren, wurde die 3-AT-Konzentration auf bis zu 20 mM erhöht, was jedoch keine entscheidende Verbesserung brachte. Das Protein FaAP wurde in zwei Teile aufgeteilt, um die Autoaktivierungsdomäne näher einzugrenzen. Tatsächlich konnte die Autoaktivierungsdomäne im C-terminalen Teil von FaAP lokalisiert werden (Abbildung 29). Auch MdAP konnte in dieser Studie als ein Autoaktivator des Reportergens in Kombination mit dem leeren „Beute“-Vektor identifiziert werden. Die Autoaktivität von MdAP wurde bisher noch nicht beschrieben (Puehringer, Zinoecker et al. 2003). Die Ergebnisse des Hefe Zwei-Hybrid Systems waren insgesamt nicht eindeutig, da die Sequenz von FaAP, welche für die Wechselwirkung verantwortlich sein könnte, durch die Fragmentierung zerstört worden sein könnte oder sich neben der Autoaktivierungssequenz in dem C-terminalen Teil des Proteins befindet (Maier, Maier et al. 2012). Die nicht eindeutigen Ergebnisse des Hefe Zwei-Hybrid Systems mussten deshalb durch eine unabhängige zusätzliche Analysenmethode verifiziert werden, um die mögliche physikalische Interaktion der Fra a 1 Isoformen und FaAP zu untersuchen.

2.2 *In vitro* Interaktionsanalyse mittels des „time-resolved DNA switching“ Systems

Die „time-resolved DNA switching“ Methode, bei welcher 48-x DNA Stücke an einem Biochip immobilisiert wurden und welche durch in μ s wechselnde Spannung eine Auf- und Abwärtsbewegung zeigen, die anschließend in einem Fluoreszenzhistogramm aufgezeichnet wird, wurde als alternative Methode zur Analyse von Proteininteraktionen gewählt (Langer, Hampel et al. 2013). Die Studie lieferte eindeutige Beweise für die physikalische Assoziation von Fra a 1.01E, Fra a 1.02 und Fra a 1.03 mit FaAP *in vitro*. Die Validität des Systems wurde bestätigt, indem die Bindung der Allergene an einen allergenspezifischen Antikörper (Anti-Fra a 1.02; II.1.13, II.4.1.29.b, III.3.3) bestimmt wurde und die bekannte physikalische Wechselwirkung von RCAR8 und ABI2 reproduziert werden konnte (Raghavendra, Gonugunta et al. 2010). Die kinetischen Daten belegten, dass Fra a 1.01E die stärkste Affinität zu FaAP-eGFP zeigt, gefolgt von Fra a 1.03 und Fra a 1.02 (Tabelle 30). Die Interaktion scheint prinzipiell unabhängig von der Fra a 1 Isoform zu sein, da FaAP mit allen drei Fra a 1 Isoformen interagiert.

2.3 Konzentrationsabhängige und FaAP-unabhängige Dimerisierung von Fra a 1.01E

Laut der Berechnung des hydrodynamischen Durchmessers durch das Lollipop-Modell weist Fra a 1.01E einen deutlich größeren hydrodynamischen Durchmesser verglichen mit Fra a 1.02 und Fra a 1.03 auf (Abbildung 35) (Langer, Hampel et al. 2013). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass zwei Moleküle von Fra a 1.01E an einem 48-x DNA Fragment binden und Fra a 1.01E somit als Dimer nachgewiesen werden kann. Da Fra a 1.01E in der Interaktion mit FaAP-eGFP eine deutlich größere Verschiebung der Fluoreszenzkurve verglichen mit der geringeren Verlagerung der Fluoreszenzkurve von Fra a 1.02 und Fra a 1.03 im Komplex mit FaAP-eGFP zeigte, könnte dies darauf hinweisen, dass ein Fra a 1.01E Dimer mit zwei FaAP-eGFP Fusionsproteinen gebunden an zwei NTA₃-DNA-Verknüpfungen interagiert (Abbildung 34). Auf diese Weise verketteten sich die DNA Stränge auf der Biochipoberfläche (Knezevic, Langer et al. 2012). Kürzlich wurde gezeigt, dass Fra a 1.01E als Monomer in Lösung und in der 3D-Kristallstruktur vorliegt (Von Loetzen, Schweimer et al. 2012). Des Weiteren ist in einem denaturierenden Polyacrylamidgel nur eine klare Bande eines Monomers für Fra a 1.01E vorhanden. Die vorliegenden Ergebnisse des „time-resolved DNA switching“ Systems zeigten jedoch eine Dimerisierung von Fra a 1.01E und auch in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel konnte ebenfalls eine konzentrationsabhängige und FaAP-unabhängige Oligomerisierung von Fra a 1.01E

nachgewiesen werden (Abbildung 36). Auch einer der wichtigsten Vertreter der PR-10 Proteinfamilie, das Birkenpollenallergen Bet v 1, welches direkt aus Birkenpollen isoliert wurde, bildet Dimere (Bufe, Spangfort et al. 1996). Die Dimerisierung wurde durch eine Western Blot Analyse mit einem monoklonalen Antikörper bestätigt und beide, sowohl das Monomer als auch das Dimer, zeigten eine RNase Aktivität. AmPR-10 aus der Pflanze *Astragalus mongholicus* der chinesischen Medizin (Yan, Qi et al. 2008) und SPE16 aus *Pachyrrhizus erosus*, der mexikanischen Süßkartoffel (Wu, Li et al. 2002) bilden Homodimere in Lösung. Des Weiteren scheint die Dimerisierung einer Norcoclaurin-Synthase (NCS), einem anderen PR-10 Protein, wichtig für die Enzymaktivität zu sein (Berkner, Schweimer et al. 2008).

Die Allergenkonzentration und der Oligomerisierungsstatus von Allergenen haben einen enormen Einfluss auf ihr allergenes Potenzial. Es wurde gezeigt, dass wohl einige Allergene in ihrem niedrigen Konzentrationsstatus als Monomere "inaktiv" sind. Bei höheren Konzentrationen sind diese Allergene als Oligomere "aktiv". Einige wichtige Mitglieder der PR-10 Proteinfamilie, wie das Birkenpollenallergen Bet v 1, das Haupt-Apfelallergen Mal d 1, das Karottenallergen Dau c 1 und das Sellerieallergen Api g 1 weisen als Monomere ein geringes allergenes Potential auf. Aber in einem höheren Oligomerisierungszustand wie zum Beispiel als Dimere steigt das allergene Potenzial und sie können als hyperallergene Proteine bezeichnet werden (Rouvinen, Jänis et al. 2010). In einer kürzlich durchgeführten Analyse der transkriptionellen und translationalen Expression konnte Fra a 1.01 in dem Genotyp *F. xananassa* cv. Akihime als die hyperallergene Isoform nachgewiesen werden. Wobei hier anzumerken ist, dass keine Informationen über die eingesetzten Konzentrationen vorliegen und auch ein Genotyp untersucht wurde, welcher nicht in den vorliegenden Untersuchungen einbezogen wurde (Ishibashi, Nabe et al. 2018). Die Isoform Fra 1.01E konnte als ein hypoallergenes Erdbeerallergen in einem Basophilen Aktivierungstest mit den eingesetzten Proteinkonzentrationen von 0,5 ng, 5 ng und 50 ng identifiziert werden (Franz-Oberdorf, Eberlein et al. 2016). Darüber hinaus wurden weitere Basophilen Aktivierungstest Analysen mit einer höheren Konzentration von 500 ng rekombinantem Fra a 1.01E Protein durchgeführt. Die Erhöhung der Proteinkonzentration führt zu einem enormen Anstieg der Basophilenaktivierung mit einem Unterschied von 69% zwischen 50 ng und 500 ng eingesetzten rekombinanten Proteins Fra a 1.01E in dem Test (Abbildung 21). Im Gegensatz zu Fra a 1.01E zeigen die beiden Isoformen Fra a 1.02 und Fra a 1.03 keinen relevanten Anstieg der Basophilenaktivierung zwischen 50 ng und 500 ng. Somit führt der Oligomerisierungsstatus in dem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel, die Dimerisierung im „time-resolved DNA switching“ System und das signifikant erhöhte allergene Potenzial von Fra a 1.01E in hoher Konzentration (500ng) zu der Schlussfolgerung, dass die Isoform Fra a 1.01E abhängig von der Konzentration und folglich auch abhängig vom Oligomerisierungsstatus ein hyperallergenes Erdbeerallergen ist. Es scheint, dass der Oligomerisierungsstatus des Erdbeerallergens Fra a 1.01E signifikant das allergene Potential des Proteins beeinflusst.

2.4 Fra a 1 Isoformen als Transporter für Metabolite – eine Hypothese

Ein weiteres herausragendes Beispiel für die PR-10 Proteinfamilie und für homologe Proteine von Bet v 1 sind die RCAR Proteine, die aus 14 Mitgliedern bestehen (Abbildung 17). Vier RCARs (RCAR11, 12, 13 und 14) bilden dimere Strukturen in Lösung (Yin, Fan et al. 2009, Klingler, Batelli et al. 2010, Hao, Yin et al. 2011, Santiago, Dupeux et al. 2012). Die RCAR-Proteine enthalten den konservierten Loop 2 (CL2), welcher nach der Bindung mit Abscisinsäure eine konformative Umlagerung zur Bildung der Interaktionsoberfläche für PP2C durchläuft. In der dimeren Struktur von RCAR14 kann die konformative Umlagerung von CL2 durch das Dimer eingeschränkt sein. Folglich verhindert die dimere Struktur die Bindung von ABA und die Interaktion von PP2C mit RCAR14 (Hao, Yin et al. 2011). Bisher konnte die funktionelle Bedeutung der Dimerisierung von PR-10 Proteinen noch nicht nachgewiesen werden.

Im Falle von Fra a 1.01E könnte die physikalische Wechselwirkung des Dimers mit FaAP eine wichtige physiologische Wirkung haben, ähnlich der enzymatischen Aktivität des NCS Dimers (Berkner, Schweimer et al. 2008) und der Hemmung der RCAR14-ABA-PP2C Wechselwirkung durch das RCAR14 Dimer, welches den nachgeschalteten ABA-Weg beeinflusst (Hao, Yin et al. 2011). Da PR-10 verwandte

Proteine einen Hohlraum für die Bindung von Liganden wie Phytosteroiden und Flavonoiden bilden (Marković-Housley, Degano et al. 2003, Zubini, Zambelli et al. 2009), ist es denkbar, dass PR-10 Proteine als Pflanzenhormon- und Sekundärmetaboliten-Transporter wirken. Multimere Komplexe, in welche orthologe Proteine von FaAP involviert sind, könnten eine wesentliche Funktion beim Transport von Metaboliten aufweisen. In ähnlicher Weise wurde bereits gezeigt, dass der zytosolische Komplex eines PR-10 Proteins und eines „leucin-rich repeat“ Proteins 1 (LRR1) aus Pfeffer (*Capsicum annuum*) für die Signalübertragung von Zelltod-vermittelten Abwehrsignalen verantwortlich ist (Choi, Hwang et al. 2012). LRR1 wirkt hier als positiver Regulator des hypersensitiven Zelltods, der durch das PR-10 Protein ausgelöst wird. Auch für Bet v 1 und Pru av 1 konnte in Protein-Ligand Interaktionsstudien basierend auf deren Kristallstrukturen nachgewiesen werden, dass PR-10 Proteine wohl fähig sind mit mehreren unterschiedlichen Liganden wie zum Beispiel Phytohormonen, Fettsäuren und Flavonoiden auch an verschiedenen Bindungsstellen zu interagieren (Gajhede, Osmark et al. 1996, Neudecker, Schweimer et al. 2001, Mogensen, Wimmer et al. 2002, Marković-Housley, Degano et al. 2003, Koistinen, Soininen et al. 2005). Somit könnte auch das Vorkommen von vielen Bet v 1, Mal d 1 und Fra a 1 Isoformen die Notwendigkeit von vielen Transportern für unterschiedliche Metabolite in verschiedene Zielkompartimente widerspiegeln (Muñoz, Hoffmann et al. 2010). Auch das in Bet v 1, Pru av 1 und Fra a 1 Isoformen nachgewiesene P-Loop Motiv (Abbildung 11), welches ebenso in vielen DNA- und ATP/GTP-bindenden Proteinen gefunden wurde (Saraste, Sibbald et al. 1990), weist auf eine mögliche Rolle der Allergene im Signalweg hin (Fujimoto, Nagata et al. 1998, Laffer, Hamdi et al. 2003, Muñoz, Hoffmann et al. 2010).

2.5 Positivkontrollen: Interaktion zwischen RCAR8 und ABI2 auch ABA-unabhängig

Die bekannte Interaktion von RCAR8-ABA-ABI2 wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Die starke Bindung zwischen diesen drei Komponenten wurde bereits nachgewiesen (Raghavendra, Gonugunta et al. 2010). Die Wechselwirkung des Komplexes in Gegenwart von ABA konnte verifiziert werden (K_D von $1,9 \pm 0,5$ nM). Es konnte jedoch auch die Interaktion der beiden Proteine RCAR8 und ABI2 in Abwesenheit von ABA nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass RCAR8 und ABI2 auch in einer ABA-unabhängigen Weise interagieren können (Abbildung 31, Tabelle 29).

Die Bestimmung der Bindung zwischen Fra a 1.01E, Fra a 1.02, Fra a 1.03 und dem polyklonalen Anti-Fra a 1.02 Antikörper diente als zuverlässige zweite Positivkontrolle und Test für die Spezifität des Antikörpers. Die Ergebnisse der „time-resolved DNA switching“ Messungen spiegeln sehr gut die Aminosäuresequenzähnlichkeiten der Proteinsequenzen wider. Fra a 1.02 zeigt die höchste und schnellste Interaktion mit dem Antikörper, gefolgt von Fra a 1.03 mit einer 80,1%-igen Aminosäuresequenzähnlichkeit zu Fra a 1.02 und Fra a 1.01E mit einer 78,9%-igen Aminosäuresequenzähnlichkeit bezogen auf Fra a 1.02 (Abbildung 30, Tabelle 28).

2.6 Mögliche Funktion des Komplexes Fra a 1-FaAP in der Autophagie durch eine weitere Interaktion mit dem Protein ATG8

Das Protein FaAP hat ein orthologes Protein in der Modellpflanze *A. thaliana* mit einer Proteinsequenzähnlichkeit von 46%. Das orthologe Protein AtAP (AAD 21467.1; Lokusdetails bei TAIR: AT2G35900) wird auch als hypothetisches Protein beschrieben (siehe Anhang V.2, Abbildung 42). In einer umfangreichen Studie zur Untersuchung der Netzwerkevolution des *Arabidopsis* Interaktomes wurde das hypothetische Protein AtAP in eine Zwei-Hybrid-Interaktionsstudie eingebunden. AtAP als Beute-Partner (transkriptionelle Aktivierungsdomäne; GAD) zeigte eine Interaktion mit den beiden Proteinen Atg8d und Atg8f, welche den Köder-Partner (DNA-Bindedomäne; GBD) im Zwei-Hybrid System repräsentierten. Die Proteine Atg8d/f (Lokusdetails bei TAIR: AT4G16520, AT2G05630) werden als Autophagie-bezogene Proteine 8d/f beschrieben (Pourcel, Irani et al. 2010, Consortium 2011, Braun, Aubourg et al. 2013, Woo, Park et al. 2014). Die Atg8 Proteinfamilie, die für Ubiquitin-ähnliche Proteine kodiert, ist an verschiedenen Stadien des wichtigen Autophagieprozesses beteiligt, wie dem intrazellulären Membrantransport (Shpilka, Weidberg et al. 2011). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein Transportweg für Anthocyanine, welcher im Endomembransystem ko-lokalisiert wurde, mit dem endoplasmatischen Retikulum-zu-Vakuole-Weg für Proteinsortierung in *Arabidopsis* überlappt und bei der Bildung von vakuolären Einstülpungen mitwirkt. Es handelt sich um einen neuartigen und

interessanten Mechanismus des vesikulären Transportes und der vakuolären Sequestrierung von Anthocyaninen (Poustka, Irani et al. 2007). Auch für Bet v 1 und Mal d 1 (77% Sequenzähnlichkeit mit Bet v 1) konnte eine überwiegend pH-abhängige Strukturänderung der Allergene beobachtet werden, welche in dem B-Status in der Lage sind Membranen zu permeabilisieren und einen Fluoreszenzfarbstoff zu transportieren (Mogensen, Ferreras et al. 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Fra a 1 direkt mit der Flavonoidbiosynthese verknüpft ist und, dass das Fra a 1 Allergen eine wesentliche biologische Funktion in der Pigmentbildung in Erdbeerfrüchten innehat (Muñoz, Hoffmann et al. 2010). Dies wurde durch ein Experiment zur transienten RNAi-vermittelten Herabregulierung (Hoffmann, Kalinowski et al. 2006, Muñoz, Hoffmann et al. 2010), Strukturanalysen (Casañal, Zander et al. 2013a, Casanal, Zander et al. 2013b) und den Proteomanalysen von einer natürlich weiß-fruchtigen Erdbeersorte (Hjernø, Alm et al. 2006) demonstriert. Die Interaktion zwischen den Fra a 1 Isoformen und FaAP und die Assoziation zwischen Arabidopsis AtAP, dem zu FaAP orthologen Protein, und Atg8d/f liefern einen ersten Anhaltspunkt für die biologische Funktion von Fra a 1. Eine mögliche Wechselwirkung dieser drei Proteine (Fra a 1, FaAP und Atg8d/f) und die Fra a 1 abhängige Pigmentbildung in reifen Früchten kann mit der Transformation von Vakuolen während der Fruchtentwicklung in Verbindung stehen, welche als Speicherkompartimente für Anthocyaninpigmente dienen.

FaAP konnte als Interaktionspartner des Erdbeerallergens Fra a 1.01E, Fra a 1.02 und Fra a 1.03 bestätigt werden. Obwohl eine Y2H Analyse erste Beweise für eine physikalische Interaktion lieferte, waren die Ergebnisse durch eine starke Autoaktivierungsaktivität der C-terminalen Domäne von FaAP nicht schlüssig. Doch die Messungen mit dem neuen und unabhängigen „time-resolved DNA switching“ Systems lieferten die positiven Nachweise für die Protein-Protein Interaktion zwischen FaAP und den drei Fra a 1 Isomeren sowie zwischen RCAR8, ABI2 und Abscisinsäure. Die Daten bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen der physiologischen Funktion von PR-10 Proteinen in Entwicklungsprozessen, dem Sekundärstoffwechsel und einer möglichen antimikrobiellen Aktivität der PR-10 Proteine.

3. Schlussfolgerung

Die in dieser Dissertation ermittelten Daten zeigen, dass Fra a 1.02, welches eine von der Reifung der Erdbeerfrucht abhängige Genexpression aufweist und ein homologes Protein des Haupt-Birkenpollenallergens Bet v 1 ist, das Haupt-Erdbeerallergen ist. Doch auch die Isoform Fra a 1.01E kann in höherer Konzentration durch eine Dimerisierung ein hohes allergenes Potential entwickeln. Es konnte gezeigt werden, dass kleinere Veränderungen in der Aminosäuresequenz das allergene Potential von paralogen Proteinen entscheidend verändern können, obwohl die Tertiärstruktur der Proteine nahezu identisch ist. Die ermittelten Daten und die Schlussfolgerungen sind essenziell für die Züchtung von hypoallergenen Erdbeersorten mit Fra a 1.02 als Marker.

Das identifizierte Haupt-Erdbeerallergen Fra a 1.02, welches für das Protein mit dem höchsten allergenen Potential der 21 Isoformen des Bet v 1-homologen Allergens kodiert, zeigte in Früchten der *F. xananassa* Kultivare Elsanta und Mara des Bois ein um das 110- bzw. 220-fach höhere Expressionslevel als in *F. vesca* rot-fruchtig Wildtyp und *F. vesca* cv. Yellow Wonder. Das Ergebnis der geringen relativen Genexpression von Fra a 1.02 mit einem Wert von 1,7 bestätigt die Vermutung, dass es sich bei *F. vesca* cv. Yellow Wonder um einen hypoallergenen Erdbeergenotyp handelt. Die Aktivierung von basophilen Granulozyten durch phenolische Proteinextrakte aus verschiedenen Erdbeergenotypen korrelieren gut mit dem Expressionslevel des *Fra a 1.02* Genes in den Früchten.

Verschiedene vielfältige Mutationen beeinflussen die Farbstoffbildung in Erdbeerfrüchten was zu der Schlussfolgerung führt, dass weiß-fruchtige Erdbeerfrüchte nicht zwingend frei von dem Erdbeerallergen Fra a 1 sein müssen. Früchte von *F. vesca* cv. Yellow Wonder weisen ein geringes allergenes Potential auf und sollten von Patienten mit leichter allergischer Ausprägung gegen Erdbeerallergene toleriert werden können.

FaAP konnte als Interaktionspartner des Erdbeerallergens Fra a 1.01E, Fra a 1.02 und Fra a 1.03 bestätigt werden. Obwohl eine Y2H Analyse erste Beweise für eine physikalische Interaktion lieferte, waren die Ergebnisse durch eine starke Autoaktivierungsaktivität der C-terminalen Domäne von FaAP

nicht schlüssig. Doch Messungen mit dem neuen und unabhängigen „time-resolved DNA switching“ System lieferten die Nachweise für die Protein-Protein-Interaktion zwischen FaAP und den drei Fra a 1 Isoformen sowie RCAR8, ABI2 und Abscisinsäure. Die Daten bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen der physiologischen Funktion von PR-10 Proteinen in Entwicklungsprozessen, dem Sekundärstoffwechsel und einer möglichen antimikrobiellen Aktivität der PR-10 Proteine.

Auch die Interaktion der beiden Proteine RCAR8 und ABI2 in Abwesenheit von ABA konnte nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass RCAR8 und ABI2 auch in einer ABA-unabhängigen Weise interagieren können.

Die Interaktion zwischen den Fra a 1 Isoformen und FaAP und die Assoziation zwischen AtAP, das zu FaAP orthologe Protein, und Atg8d/f liefern einen ersten Anhaltspunkt für die biologische Funktion von Fra a 1. Eine mögliche Wechselwirkung dieser drei Proteine (Fra a 1, FaAP und Atg8d/f) und die Fra a 1 abhängige Pigmentbildung in reifen Früchten kann mit der Transformation von Vakuolen während der Fruchtentwicklung in Verbindung stehen, welche als Speicherkompartimente für Anthocyaninpigmente dienen

V Anhang

1. Kodierende Sequenzen

1.1 Nukleotidsequenz von Fra a 1.01E (Akzessionsnummer: AM236319)

ATGGGTGTTTACTTATGAAAACGAGTTCACCTCCGATATCCCAGCACCTAAGTTGTTCAAGGCCTTCGTTCTC
GATGCCGACAACCTCATCCCCAAGATTGCACCTCAGGCAGTTAAGTGCGCCGAGATCCTCGAAGGAGATGGCG
GCCCCGGAACCATCAAGAAGATCACCTTTGGTGAAGGCAGCCACTACGGGTACGTCAAGCACAAGATCCACTC
CATTGACAAAGTGAACCACACCTACAGCTACAGTTTGATCGAGGGAGATGCCTTGTGAGAGAACATCGAGAAG
ATCGACTACGAGACCAAGTTGGTATCAGCTCCTCATGGAGGAACCATCATCAAGACCACCAGCAAGTACCACA
CCAAGGGAGATGTCGAGATCAAGGAAGAGCACGTCAAGGCCGGCAAAGAGAAGGCCGCGCACCTCTTCAAG
CTCATCGAGGGATACCTCAAGGACCACCCAGCGAATACAATAA

1.2 Nukleotidsequenz von Fra a 1.02 (Akzessionsnummer: GQ148818)

ATGGGTGTGTTCACTTATGAAACCGAGTTCACCTCCGTCATCCCACCACCAAGATTGTTCAAGGCTTTCATCCTT
GATGCCGACAATCTCATCCCCAAGATTGCTCCCCAAGCAGTTAAGTGTGCTGAAATCATTGAAGGAGACGGAG
GCGTAGGCACCATCAAGAAGATCACCTTTGGCGAAGGCAGCCAGTTCGGCTCAGTGACCCACAAGATCGATG
GGATTGACAAAGAGAAGTTGTGTACAGCTACAGTTTGGTGAAGGAGATGCCTTGTCCGACAAGATTGAGAA
GATCTTACGAGACCAAATTGGTGTCTTCCGATGGAGGATCCATCATCAAGAGCACAAGCAACTACCACA
CCAAAGGTGACGTGGAGATCAAGGAAGAGCATGTCAAGGCTGGAAAAGAGAAGGCCGTCGCACCTCTTCAAG
CTTGTGAAGGCTACCTCTTGGCCAATCCTAATGAATACTGTAA

1.3 Nukleotidsequenz von Fra a 1.03 (Akzessionsnummer: GQ148819)

ATGGGTGTGTTCACTACGAATCCGAGTTCACCTCAGTCATCCCACCACCTAAGTTGTTCAAGGCTTTCGTCCTT
GACGCCGACAACCTCATCCCCAAGATTGCCCTCAGGCTGTGAAGAGTGTGAAATCATTGAAGGAGATGGAG
GTGTTGGAACCATCAAGAAGATCCATCTTGGTGAAGGAAGTGAATACAGCTACGTGAAGCATAAGATTGATG
GAATCGACAAAGACAAGTTCGTGTACAGCTACAGTATCATCGAGGGAGATGCTATCGGAGACAAGATTGAGA
AGATCTCTATGAGATTAAGTTGGTAGCATCCGGTGGAGTTCCATCATCAAGAGCACCAGTTACTACCACACC
AAGGGTGAGGTCGAGATTAAGGAAGAGCATGTTAAGGCCGGAAAAGGAAAGAGCCGCTGGTCTGTTCAAGAT
CATTGAGAACCACCTCTTGGCCATCCTGAGGAATACAATAA

1.4 Nukleotidsequenz von Mal d 1 (Akzessionsnummer: AJ417551)

ATGGGTGTCTACACATTTGAGAACGAGTACACCTCTGAGATTCACCACCAAGATTGTTCAAGGCCTTGTCTCT
CGATGCTGATAACCTCATCCCCAAGATTGCACCCAGGCAATCAAGCATGCTGAGATCCTTGAAGGAGACGGT
GGCCCTGGAACCATCAAGAAGATCACTTTTGGTGAAGGCAGCCAATACGGCTACGTGAAGCACAAGATCGACT
CGTTGACGAGGCAAACACTACTACATCGCTACACTTTGATTGAAGGAGATGCTTTGACAGACACCATTGAGAA
GGTCTCTTACGAGACCAAGTTGGTGGCATCTGGAAGTGGTTCCATCATCAAGAGTATCAGCCACTACCACACC
AAGGGTGATGTTGAGATCAAGGAAGAGCACGTCAAGGCTGGCAAAGAGAAGGCTCATGGTTTGTCAAGCTT
ATTGAGAGCTACCTCAAGGACCACCCGACGCATACAATAA

1.5 Nukleotidsequenz von FaAP (Akzessionsnummer: KF785812)

ATGGGTTGGGTGTGGAAGGACGACGACGAACAAGGAGGCCACGTTAATCCATCAGCGGCTGACATCAGCCCC
AGATTGGACGCGACCGGTGCTCCACGAGAAAGGTGGTGAAGGACGAGTCAAGACGGAGGAGGTGGAGC
CCGAAAAGTTCATCAGAAAAGTGCAGAAAGACCGAGGAGTTCTCCGCGACTGCGTTGGCCGGCCATTGAAG
TGGTACAATCCAACAAGAGTACTGAAGATGATGTCACAGACCAGGTGATGAAAGGGTCTGTGTCCTTTGG
GTCAGCAGACAATGGAGCATTTAACTTCCCTGGACTACAGCATGATATCGATGAAATTGAACACAACCTTCTAG
GAGGGCTCAGCCGATTTTTGAAGCTGCTGAGGATATGAAGAATGGATTCTTCAGTTTATTGGCATTCCACAC
ATCTTTGATGAGGGACCTCTACTTCACTACCATCTCCGAGGAGAGAGATACCTATTGACAGCCCTCGTCAGCT
GGAAGCTTTTCAAAAAGCATATGGCACAAAGTCTGGGGAGGTTGATCTTTCTGGGTTGGCAAGAGATGTTTGA

1.6 Nukleotidsequenz von MdAP (Akzessionsnummer: AAD21467)

ATGGGGTGGGTGTGGAGGGACGACGAGGATGATGACAACAATTCAACGGCGATTGACATAAATCCTAGATCG
 GACGGCGATCGATGCTTGACGAGGAAGGTGGTGAAGATGCAGTGCAAGACTGAGGAGGTGGAGCCTGGAAA
 GTTCGTCAGGAAGTGCAGAGAAGACCGAGCAGCTTCTCAGGGACTGCGCCGGCCGGCCTGTAGAAGTGGTGCA
 ATCCAACAAAGAGTACACTGAACATGACGTCACTGACGAGGTGCTCAAAGGGTCTGCCACCTTTGGGTCA
 CAGCACGGAGCATTGGACTTCCCAGGGCTACGCGGTGACATTGAAGACATTGAACGCACTTTATGGGTGGCC
 TCAGCCGATTCTTTGAGGCTGCTGAGGAGTTGAAGAGCGGCTTCTCAGTGCTTTTGGGAACATCTTTGATGA
 GGGACCTTCTCCCCACTACCTCCTAGGAGGCGCGAGGTACCCATAGAAGGCCATCATCAGCAGGAAGCTTTT
 CCTAAAGCAAGCGGTAGCGACGACTCAGGACACGTTGATCTCTCTGGCTTGGCAAGAGAAGTTTGA

1.7 Nukleotidsequenz von eGFP (Akzessionsnummer: KM396758.1)

ATGAGTAAAGGAGAAGAAGTCTTCTACTGGAGTGGTCCCAGTCTTGTGAATTAGATGGCGATGTTAATGGGC
 AAAAATTCTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTACCCTTAATTTATTTGCACT
 ACTGGGAAGCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTTATGGTGTTCATGCTTCTCAAGATAC
 CCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAAGTATATT
 TTACAAAGATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATC
 GAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACAAAATGGAATACAACATAACTCAC
 ATAATGTATACATCATGGGAGACAAACAAAGAATGGCATCAAAGTTAACTTCAAATTAGACACAACATTAA
 AGATGGAAGCGTTCAATTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAG
 ACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGATCACATGATCCTTCTTG
 AGTTTGTAACAGCTGCTAGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAA

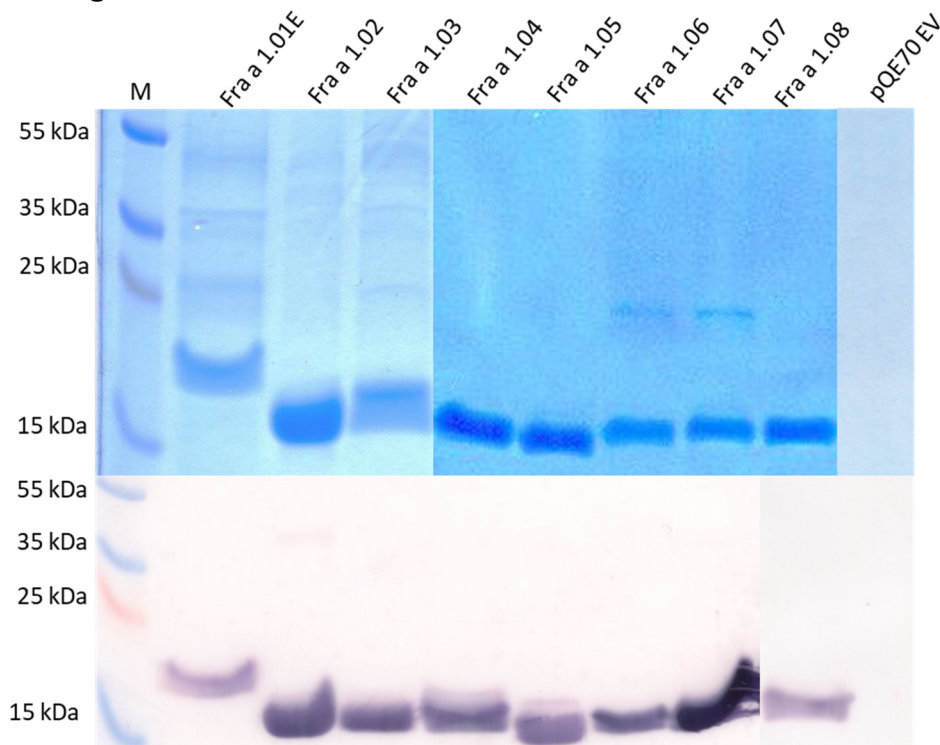
2. Abbildungen

Abbildung 38 SDS-PAGE und Western Blot Analyse der acht rekombinanten Fra a 1 Proteine (10 µg). Die SDS-PAGE wurde mit Coomassie Brilliant Blue G250 visualisiert. Die rekombinanten Proteine in der Western Blot Analyse wurden unter Verwendung des monoklonalen Anti-6 × His AP-Antikörpers nachgewiesen. Die Fra a 1 Isoformen sind von Fra a 1.01E bis Fra a 1.08 aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pQE70 (EV) analysiert. M: Proteinmarker (Abbildung 16 b; Proteingröße in kDa)

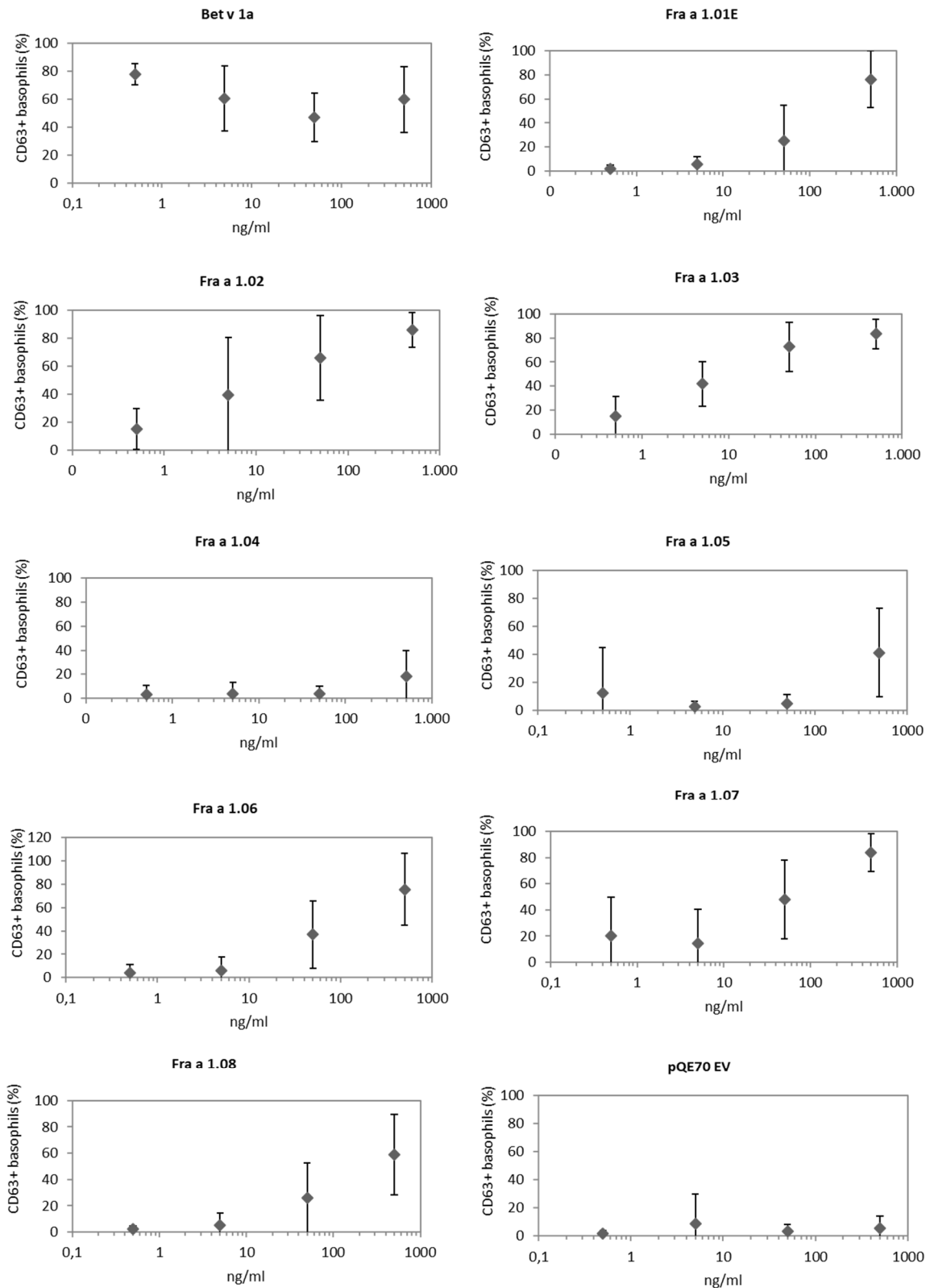


Abbildung 39 Daten der Dosis-Wirkungs-Beziehung für die CD63+ Expression auf basophilen Granulozyten (Mittelwert \pm Standardabweichung) von Birkenpollenallergikern ($n = 8$) nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Bet v 1a, acht rekombinanten Fra a 1 Proteinen und dem pQE70 Leervektor (EV). Grafiken werden im Log-Maßstab dargestellt.

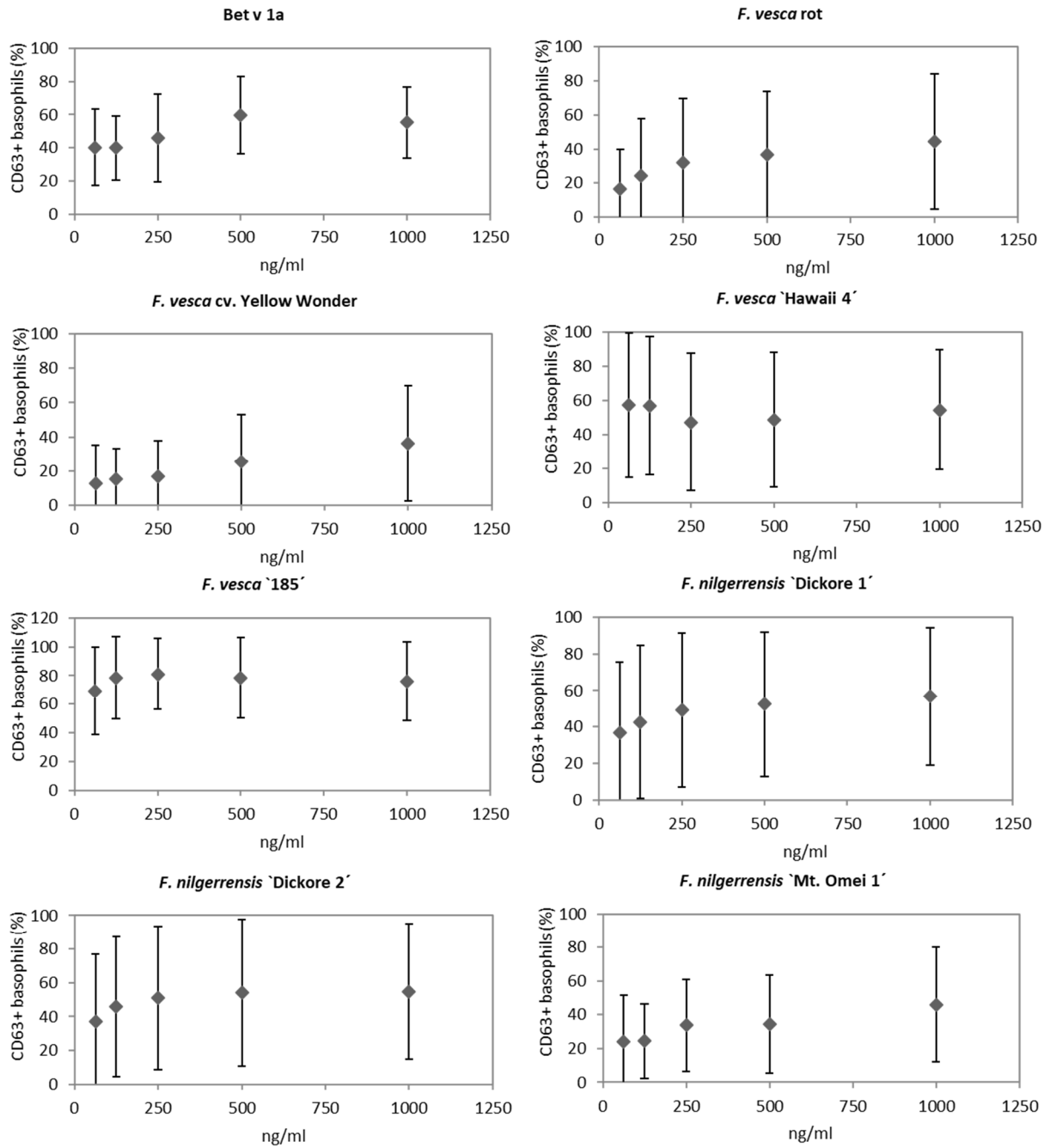


Abbildung 40 Daten für die Dosis-Wirkungs-Beziehung für die CD63+ Expression auf basophilen Granulozyten (Mittelwert ± Standardabweichung) von Birkenpollenallergikern (n = 8) nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Bet v 1a und verschiedenen phenolischen Extrakten der *Fragaria* Varietäten.

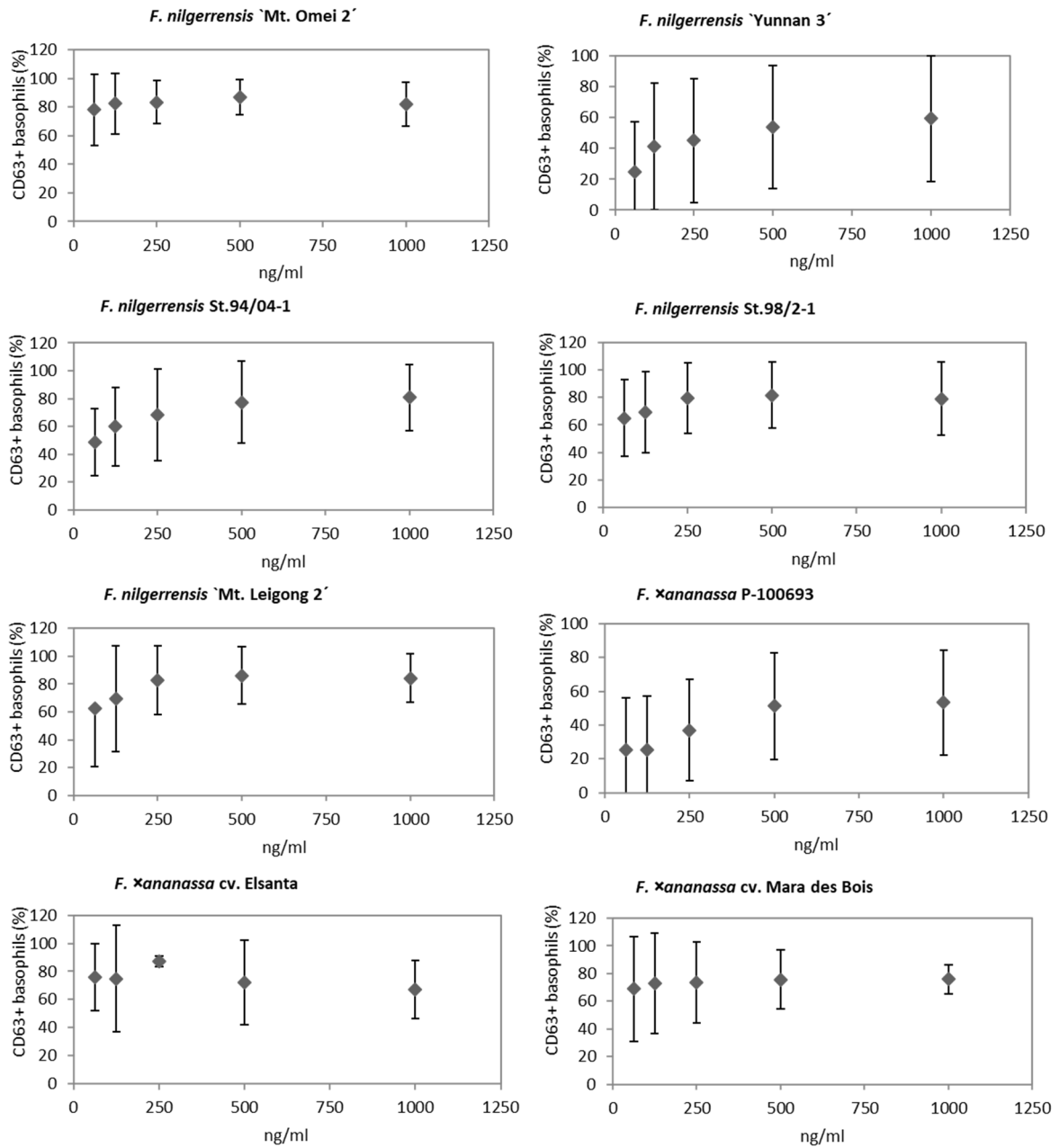


Abbildung 41 Daten für die Dosis-Wirkungs-Beziehung für die CD63+ Expression auf basophilen Granulozyten (Mittelwert \pm Standardabweichung) von Birkenpollenallergikern (n = 8) nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Bet v 1a und verschiedenen phenolischen Extrakten der *Fragaria* Varietäten.

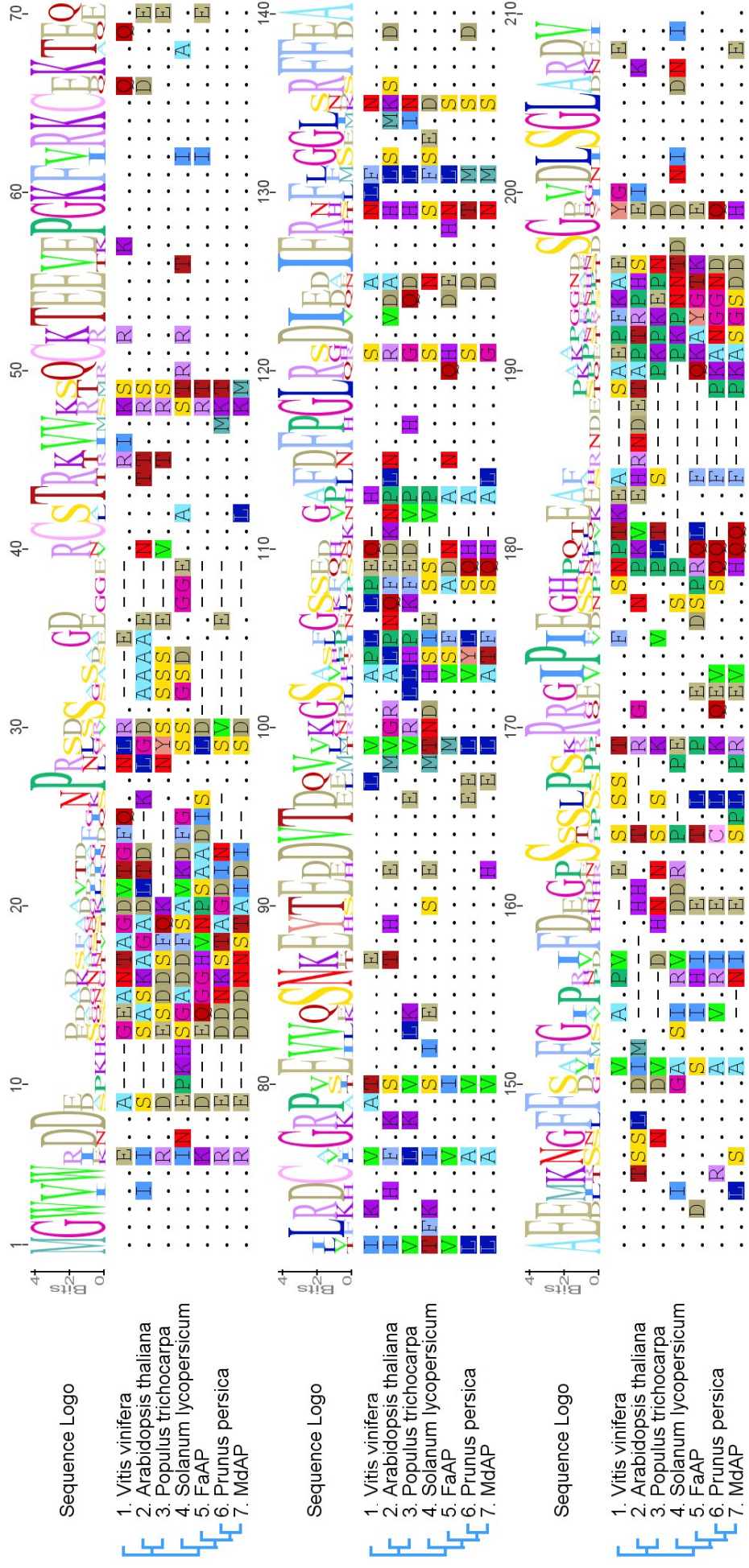


Abbildung 42 Proteinsequenzalignment von orthologen Proteinen zu MdAP im Erdbeergenom FaAP (69%, KF785812) und weiteren orthologen (hypothetischen und nicht-charakterisierten) Proteinen in *Vitis vinifera* (58%, XP_002264531.1), *Arabidopsis thaliana* (46%, AAD21467.1), *Populus trichocarpa* (59%, XP_002323365.1), *Solanum lycopersicum* (79% Identität; XM_004249348.1) und *Prunus persica* (69%; EMJ03824.1). Legende der Symbole: Übereinstimmung der Nukleotide (-); Abwesenheit von Nukleotiden (-); große Sequenz-Logo-Buchstaben zeigen das gleiche Nukleotid in allen verglichenen Sequenzen an; kleine/kleinere Sequenz-Logo-Buchstaben zeigen unterschiedliche Nukleotide in den verglichenen Sequenzen an (Rost et al. 2004).

VI Referenzen

- Aaby, K., D. Ekeberg and G. Skrede (2007). "Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity." *Journal of Agricultural Food Chemistry* **55**(11): 4395-4406.
- Aaby, K., G. Skrede and R. E. Wrolstad (2005). "Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*)." *Journal of Agricultural Food chemistry* **53**(10): 4032-4040.
- Abelson, J. N., M. I. Simon, C. Guthrie and G. R. Fink (2004). *Guide to yeast genetics and molecular biology*, Gulf Professional Publishing.
- Afrin, S., M. Gasparrini, T. Y. Forbes-Hernandez, P. Reboredo-Rodriguez, B. Mezzetti, A. Varela-López, F. Giampieri and M. Battino (2016). "Promising health benefits of the strawberry: a focus on clinical studies." *Journal of agricultural food chemistry* **64**(22): 4435-4449.
- Agati, G. and M. Tattini (2010). "Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection." *New Phytologist* **186**(4): 786-793.
- Alm, R., A. Ekefjård, M. Krogh, J. Häkkinen and C. Emanuelsson (2007). "Proteomic variation is as large within as between strawberry varieties." *Journal of proteome research* **6**(8): 3011-3020.
- Almeida, J. R., E. D'Amico, A. Preuss, F. Carbone, C. R. de Vos, B. Deiml, F. Mourgues, G. Perrotta, T. C. Fischer and A. G. Bovy (2007). "Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*)." *Archives of biochemistry biophysics* **465**(1): 61-71.
- Amil-Ruiz, F., J. Garrido-Gala, R. Blanco-Portales, K. M. Folta, J. Muñoz-Blanco and J. L. Caballero (2013). "Identification and validation of reference genes for transcript normalization in strawberry (*Fragaria x ananassa*) defense responses." *PloS one* **8**(8): e70603.
- Andersen, M.-B. S., S. Hall and L. O. Dragsted (2011). "Identification of European allergy patterns to the allergen families PR-10, LTP, and profilin from Rosaceae fruits." *Clinical reviews in allergy immunology* **41**(1): 4-19.
- Bakker, J., P. Bridle and S. J. Bellworthy (1994). "Strawberry juice colour: a study of the quantitative and qualitative pigment composition of juices from 39 genotypes." *Journal of the Science of Food Agriculture* **64**(1): 31-37.
- Bartel, P. L., J. A. Roecklein, D. SenGupta and S. Fields (1996). "A protein linkage map of *Escherichia coli* bacteriophage T7." *Nature genetics* **12**(1): 72.
- Berkner, H., K. Schweimer, I. Matecko and P. Rösch (2008). "Conformation, catalytic site, and enzymatic mechanism of the PR10 allergen-related enzyme norcochlorogenic acid synthase." *Biochemical Journal* **413**(2): 281-290.
- Bertani, G. (1951). "A method for detection of mutations, using streptomycin dependence in *Escherichia coli*." *Genetics* **36**(6): 598.
- Besbes, F., K. Franz-Oberdorf and W. Schwab (2019). "Phosphorylation-dependent ribonuclease activity of Fra a 1 proteins." *Journal of plant physiology* **233**: 1-11.
- Beuning, L., J. Bowen, H. Persson, D. Barraclough, S. Bulley and E. MacRae (2004). "Characterisation of Mal d 1-related genes in *Malus*." *Plant molecular biology* **55**(3): 369-388.
- Biedermann, T., W. Heppt, H. Renz and M. Röcken (2016). *Allergologie*, Springer-Verlag.
- Bishop, J. R. and P. Gagneux (2007). "Evolution of carbohydrate antigens—microbial forces shaping host glycomes?" *Glycobiology* **17**(5): 23R-34R.
- Blum, H., H. Beier and H. Gross (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." *Electrophoresis* **8**(2): 93-99.
- Bohlmann, J., T. Lins, W. Martin and U. Eilert (1996). "Anthranilate synthase from *Ruta graveolens* (Duplicated AS [alpha] genes encode tryptophan-sensitive and tryptophan-insensitive isoenzymes specific to amino acid and alkaloid biosynthesis)." *Plant Physiology* **111**(2): 507-514.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry* **72**(1-2): 248-254.

- Braun, P., S. Aubourg, J. Van Leene, G. De Jaeger and C. Lurin (2013). "Plant protein interactomes." *Annual review of plant biology* **64**: 161-187.
- Breiteneder, H., K. Pettenburger, A. Bito, R. Valenta, D. Kraft, H. Rumpold, O. Scheiner and M. Breitenbach (1989). "The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene." *The EMBO journal* **8**(7): 1935-1938.
- Breiteneder, H. and C. Radauer (2004). "A classification of plant food allergens." *Journal of allergy clinical immunology* **113**(5): 821-830.
- Bufe, A., M. D. Spangfort, H. Kahlert, M. Schlaak and W.-M. Becker (1996). "The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity." *Planta* **199**(3): 413-415.
- Caesar, K. (1977). "Franke, W.: Nutzpflanzenkunde. Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1976. VIII, 467 Seiten, 12× 19 cm, flexibel, DM 24, 80." *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **140**(3-4): 473-473.
- Casnal, A., U. Zander, F. Dupeux, V. Valpuesta and J. A. Marquez (2013b). "Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the strawberry allergens Fra a 1E and Fra a 3 in the presence of catechin." *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Crystallization Communications* **69**(5): 510-514.
- Casañal, A., U. Zander, C. Muñoz, F. Dupeux, I. Luque, M. A. Botella, W. Schwab, V. Valpuesta and J. A. Marquez (2013a). "The strawberry pathogenesis-related 10 (PR-10) Fra a proteins control flavonoid biosynthesis by binding to metabolic intermediates." *Journal of Biological Chemistry* **288**(49): 35322-35332.
- Catalin (1997). *Zeitkrankheit Nahrungsmittel-Allergien*, Heyne, München.
- Caubet, J.-C. and H. A. Sampson (2012). "Beyond skin testing: state of the art and new horizons in food allergy diagnostic testing." *Immunology Allergy Clinics* **32**(1): 97-109.
- Chapman, M. D., A. Pomés, H. Breiteneder and F. Ferreira (2007). "Nomenclature and structural biology of allergens." *Journal of allergy clinical immunology* **119**(2): 414-420.
- Chapple, C. and N. Carpita (1998). "Plant cell walls as targets for biotechnology." *Current opinion in plant biology* **1**(2): 179-185.
- Choi, D. S., I. S. Hwang and B. K. Hwang (2012). "Requirement of the cytosolic interaction between PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN10 and LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN1 for cell death and defense signaling in pepper." *The Plant Cell* **24**(4): 1675-1690.
- Ciardello, M. A., M. Tamburrini, M. Liso, R. Crescenzo, C. Rafaianni and A. Mari (2013). "Food allergen profiling: A big challenge." *Food research international* **54**(1): 1033-1041.
- Civello, P. M., A. L. Powell, A. Sabehat and A. B. Bennett (1999). "An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit." *Plant Physiology* **121**(4): 1273-1279.
- Coleman, S. L., R. D. Hurst, G. M. Sawyer and M. C. Kruger (2016). "The in vitro evaluation of isolated procyanidins as modulators of cytokine-induced eotaxin production in human alveolar epithelial cells." *Journal of Berry Research* **6**(2): 115-124.
- Consortium, A. I. M. (2011). "Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map." *Science* **333**(6042): 601-607.
- Dai, J., A. Gupte, L. Gates and R. Mumper (2009). "A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms." *Food chemical toxicology* **47**(4): 837-847.
- Darrow, G. M. (1966). "The strawberry. History, breeding and physiology." *The strawberry. History, breeding physiology*.
- Darwish, O., J. P. Slovin, C. Kang, C. A. Hollender, A. Geretz, S. Houston, Z. Liu and N. W. Alkharouf (2013). "SGR: an online genomic resource for the woodland strawberry." *BMC plant biology* **13**(1): 223.
- Deng, C. and T. Davis (2001). "Molecular identification of the yellow fruit color (c) locus in diploid strawberry: a candidate gene approach." *Theoretical Applied Genetics* **103**(2-3): 316-322.
- Dixon, R. A., D. Y. Xie and S. B. Sharma (2005). "Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research?" *New phytologist* **165**(1): 9-28.
- Drach (2010). "Sind Allergien eine Zivilisationskrankheit? ." <https://www.sueddeutsche.de/wissen/frage-der-woche-sind-allergien-eine-zivilisationskrankheit-1.589763>.

- Drummond, A., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper, C. Duran, M. Field, J. Heled, M. Kearse and S. G. Markowitz v5. 5. 2011.
- Eberlein, B., L. Krischan, U. Darsow, M. Ollert and J. Ring (2012). "Double positivity to bee and wasp venom: Improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate determinants." *Journal of Allergy Clinical Immunology* **130**(1): 155-161.
- Eberlein, B., I. L. Suarez, U. Darsow, F. Rueff, H. Behrendt and J. Ring (2010). "A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics." *Clinical Experimental Allergy* **40**(3): 411-418.
- Ebner, C., R. Hirschwehr, L. Bauer, H. Breiteneder, R. Valenta, H. Ebner, D. Kraft and O. Scheiner (1995). "Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin)." *Journal of Allergy Clinical Immunology* **95**(5): 962-969.
- Ebruster, H. (1959). "The prick test, a recent cutaneous test for the diagnosis of allergic disorders." *Wiener klinische Wochenschrift* **71**: 551.
- Edirisinghe, I., K. Banaszewski, J. Cappozzo, K. Sandhya, C. L. Ellis, R. Tadapaneni, C. T. Kappagoda and B. M. Burton-Freeman (2011). "Strawberry anthocyanin and its association with postprandial inflammation and insulin." *British journal of nutrition* **106**(6): 913-922.
- Erdmann, S., B. Sachs, A. Schmidt, H. Merk, O. Scheiner, S. Moll-Slodowy, I. Sauer, R. Kwiecien, B. Maderegger and K. Hoffmann-Sommergruber (2005). "In vitro analysis of birch-pollen-associated food allergy by use of recombinant allergens in the basophil activation test." *International archives of allergy immunology* **136**(3): 230-238.
- Eriksson, N. E., C. Moller, S. Werner, J. Magnusson, U. Bengtsson and M. Zolubas (2004). "Self-reported food hypersensitivity in Sweden, Denmark, Estonia, Lithuania and Russia." *Journal of investigational allergology clinical immunology* **14**(1): 70-79.
- Faber, C., A. Lindemann, H. Sticht, A. Ejchart, A. Kungl, M. Susani, R. W. Frank, D. Kraft, M. Breitenbach and P. Rösch (1996). "Secondary structure and tertiary fold of the birch pollen allergen Bet v 1 in solution." *Journal of Biological Chemistry* **271**(32): 19243-19250.
- Fahrney, D. E. and A. M. Gold (1963). "Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. I. Rates of reaction with acetylcholinesterase, α -chymotrypsin, and trypsin." *Journal of the American Chemical Society* **85**(7): 997-1000.
- FAOSTAT, F. (2014). Agricultural Organization of the United Nations, Statistics Division: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> (2014), Accessed.
- Flick, J. S. and M. Johnston (1990). "Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*." *Molecular and cellular biology* **10**(9): 4757-4769.
- Flicker, S., P. Steinberger, T. Ball, M.-T. Krauth, P. Verdino, P. Valent, S. Almo and R. Valenta (2006). "Spatial clustering of the IgE epitopes on the major timothy grass pollen allergen Phl p 1: importance for allergenic activity." *Journal of allergy clinical immunology* **117**(6): 1336-1343.
- Forbes-Hernandez, T. Y., M. Gasparri, S. Afrin, S. Bompadre, B. Mezzetti, J. L. Quiles, F. Giampieri and M. Battino (2016). "The healthy effects of strawberry polyphenols: which strategy behind antioxidant capacity?" *Critical reviews in food science nutrition* **56**(sup1): S46-S59.
- Franz-Oberdorf, K., B. Eberlein, K. Edlmann, S. Hücherig, F. Besbes, U. Darsow, J. Ring and W. Schwab (2016). "Fra a 1.02 is the most potent isoform of the Bet v 1-like allergen in strawberry fruit." *Journal of agricultural food chemistry* **64**(18): 3688-3696.
- Fujimoto, Y., R. Nagata, H. Fukasawa, K. Yano, M. Azuma, A. Iida, S. Sugimoto, K. Shudo and Y. Hashimoto (1998). "Purification and cDNA cloning of cytokinin-specific binding protein from mung bean (*Vigna radiata*)." *European journal of biochemistry* **258**(2): 794-802.
- Gajhede, M., P. Osmark, F. M. Poulsen, H. Ipsen, J. N. Larsen, R. J. Van Neerven, C. Schou, H. Løwenstein and M. D. Spangfort (1996). "X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy." *Nature structural biology* **3**(12): 1040.
- Gell, P. G. H. and R. R. A. Coombs (1963). "Clinical aspects of immunology." *Clinical Aspects of Immunology*.

- Giampieri, F., T. Y. Forbes-Hernandez, M. Gasparrini, J. M. Alvarez-Suarez, S. Afrin, S. Bompadre, J. L. Quiles, B. Mezzetti and M. Battino (2015). "Strawberry as a health promoter: an evidence based review." *Food Function* **6**(5): 1386-1398.
- Giampieri, F., S. Tulipani, J. M. Alvarez-Suarez, J. L. Quiles, B. Mezzetti and M. Battino (2012). "The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health." *Nutrition* **28**(1): 9-19.
- Gieras, A., P. Cejka, K. Blatt, M. Focke-Tejkl, B. Linhart, S. Flicker, A. Stoecklinger, K. Marth, A. Drescher and J. Thalhamer (2011). "Mapping of conformational IgE epitopes with peptide-specific monoclonal antibodies reveals simultaneous binding of different IgE antibodies to a surface patch on the major birch pollen allergen, Bet v 1." *The Journal of Immunology* **186**(9): 5333-5344.
- Giovannoni, J. J. (2004). "Genetic regulation of fruit development and ripening." *The plant cell* **16**(suppl 1): S170-S180.
- Given, N., M. Venis and D. Gierson (1988). "Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit." *Planta* **174**(3): 402-406.
- Goodman, R. P., C. M. Erben, J. Malo, W. M. Ho, M. L. McKee, A. N. Kapanidis and A. J. Turberfield (2009). "A facile method for reversibly linking a recombinant protein to DNA." *ChemBioChem* **10**(9): 1551-1557.
- Gough, J., K. Karplus, R. Hughey and C. Chothia (2001). "Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure." *Journal of molecular biology* **313**(4): 903-919.
- Grattan, C. and R. Harman (1985). "Contact urticaria to strawberry." *Contact Dermatitis* **13**(3): 191-192.
- Griesser, M., T. Hoffmann, M. L. Bellido, C. Rosati, B. Fink, R. Kurtzer, A. Aharoni, J. Munoz-Blanco and W. Schwab (2008a). "Redirection of flavonoid biosynthesis through the down-regulation of an anthocyanidin glucosyltransferase in ripening strawberry fruit." *Plant Physiology* **146**(4): 1528-1539.
- Griesser, M., F. Vitzthum, B. Fink, M. L. Bellido, C. Raasch, J. Munoz-Blanco and W. Schwab (2008b). "Multi-substrate flavonol O-glucosyltransferases from strawberry (*Fragaria x ananassa*) achene and receptacle." *Journal of Experimental Botany* **59**(10): 2611-2625.
- Halbwirth, H., I. Puhl, U. Haas, K. Jezik, D. Treutter and K. Stich (2006). "Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit." *Journal of agricultural food chemistry* **54**(4): 1479-1485.
- Hancock, J. F. and J. J. Luby (1993). "Genetic resources at our doorstep: the wild strawberries." *J BioScience* **43**(3): 141-147.
- Hancock, J. F., T. Sjulín and G. Lobos (2008). *Strawberries. Temperate fruit crop breeding*, Springer: 393-437.
- Hanelt P., H. J., Kruse K. (1993). "Urania Pflanzenreich. Blütenpflanzen 1. ." Urania-Verlag, Leipzig/Jena/ Berlin.
- Hanhineva, K., S. O. Kärenlampi and A. Aharoni (2011). "Recent advances in strawberry metabolomics." *Genomics, Transgenics, Molecular Breeding Biotechnology of Strawberry*. Glob Sci B, UK: 65-75.
- Hanhineva, K., I. Rogachev, H. Kokko, S. Mintz-Oron, I. Venger, S. Kärenlampi and A. Aharoni (2008). "Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria x ananassa*) flowers." *Phytochemistry* **69**(13): 2463-2481.
- Hanif, T., K. Dhaygude, M. Kankainen, J. Renkonen, P. Mattila, T. Ojala, S. Joenvaara, M. Mäkelä, A. Pelkonen and P. Kauppi (2019). "Birch pollen allergen immunotherapy reprograms nasal epithelial transcriptome and recovers microbial diversity." *Journal of Allergy Clinical Immunology*.
- Hao, Q., P. Yin, W. Li, L. Wang, C. Yan, Z. Lin, J. Z. Wu, J. Wang, S. F. Yan and N. Yan (2011). "The molecular basis of ABA-independent inhibition of PP2Cs by a subclass of PYL proteins." *Molecular cell* **42**(5): 662-672.
- Härtl, K., A. Denton, K. Franz-Oberdorf, T. Hoffmann, M. Spornraft, B. Usadel and W. Schwab (2017). "Early metabolic and transcriptional variations in fruit of natural white-fruited *Fragaria vesca* genotypes." *Scientific reports* **7**: 45113.

- Hausen, B. M. (1997). Allergiepflanzen, Pflanzenallergene: Handbuch und Atlas der allergie-induzierenden Wild-und Kulturpflanzen: Kontaktallergene, allergische Frühreaktionen, ecomed.
- Hauser, M., A. Roulias, F. Ferreira and M. Egger (2010). "Panallergens and their impact on the allergic patient." *Allergy, Asthma Clinical Immunology* **6**(1): 1.
- Hawkins, C., J. Caruana, E. Schiksnis and Z. Liu (2016). "Genome-scale DNA variant analysis and functional validation of a SNP underlying yellow fruit color in wild strawberry." *Scientific reports* **6**: 29017.
- Hemphill, R. and L. W. Martin (1992). "Microwave oven-drying method for determining total solids of strawberries." *HortScience* **27**(12): 1326-1326.
- Henzgen, M., S. Vieths, I. Reese, S. Erdmann, T. Fuchs, L. Jäger, J. Kleine-Tebbe, U. Lepp, B. Niggemann and J. Saloga (2005). "Nahrungsmittelallergien durch immunologische Kreuzreaktionen." *Allergo Journal* **14**(1): 48-59.
- Hjernø, K., R. Alm, B. Canbäck, R. Matthiesen, K. Trajkovski, L. Björk, P. Roepstorff and C. Emanuelsson (2006). "Down-regulation of the strawberry Bet v 1-homologous allergen in concert with the flavonoid biosynthesis pathway in colorless strawberry mutant." *Proteomics* **6**(5): 1574-1587.
- Hoffmann-Sommergruber, K. (2000). "Plant allergens and pathogenesis-related proteins." *International archives of allergy immunology* **122**(3): 155-166.
- Hoffmann-Sommergruber, K. (2002). Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens, Portland Press Limited.
- Hoffmann-Sommergruber, K., M. Vanek-Krebitz, C. Radauer, J. Wen, F. Ferreira, O. Scheiner and H. Breiteneder (1997). "Genomic characterization of members of the Bet v 1 family: genes coding for allergens and pathogenesis-related proteins share intron positions." *Gene* **197**(1-2): 91-100.
- Hoffmann, T., G. Kalinowski and W. Schwab (2006). "RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis." *The Plant Journal* **48**(5): 818-826.
- Horvath, A., J. Sánchez-Sevilla, F. Punelli, L. Richard, R. Sesmero-Carrasco, A. Leone, M. Höefer, P. Chartier, E. Balsemin and T. Barreneche (2011). "Structured diversity in octoploid strawberry cultivars: importance of the old European germplasm." *J Annals of applied biology* **159**(3): 358-371.
- Huang, Y., E. Park, I. Edirisinghe and B. M. Burton-Freeman (2016). "Maximizing the health effects of strawberry anthocyanins: understanding the influence of the consumption timing variable." *Food function* **7**(12): 4745-4752.
- Hummer, K. E., N. Bassil and W. Njuguna (2011). *Fragaria. Wild crop relatives: Genomic and breeding resources*, Springer: 17-44.
- Hummer, K. E., P. Nathewet and T. Yanagi (2009). "Decaploidy in *Fragaria iturupensis* (Rosaceae)." *American journal of botany* **96**(3): 713-716.
- Hyun, T. K. and J.-S. Kim (2011). "Genomic identification of putative allergen genes in woodland strawberry (*Fragaria vesca*) and mandarin orange (*Citrus clementina*)." *Plant Omics J* **4**(7): 428-434.
- Iannetta, P. P., L. J. Laarhoven, N. Medina-Escobar, E. K. James, M. T. McManus, H. V. Davies and F. J. Harren (2006). "Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit." *Physiologia Plantarum* **127**(2): 247-259.
- Ihaka, R. and R. Gentleman (1996). "R: a language for data analysis and graphics." *Journal of computational and graphical statistics* **5**(3): 299-314.
- Ishibashi, M., T. Nabe, Y. Nitta, H. Tsuruta, M. Iduhara and Y. Uno (2018). "Analysis of major paralogs encoding the Fra a 1 allergen based on their organ-specificity in *Fragaria x ananassa*." *Plant cell reports* **37**(3): 411-424.
- Jia, H.-F., Y.-M. Chai, C.-L. Li, D. Lu, J.-J. Luo, L. Qin and Y.-Y. Shen (2011). "Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening." *Plant physiology* **157**(1): 188-199.
- Joseph, S. V., I. Edirisinghe and B. M. Burton-Freeman (2016). "Fruit polyphenols: A review of anti-inflammatory effects in humans." *Critical reviews in food science nutrition* **56**(3): 419-444.
- Kaiser, R., V. Mageney, K. Schwefel, D. Vollmers, A. Krüger and R. Horn (2016). "Genotyping of red and white fruited strawberry (*Fragaria L.*) accessions and hybrids based on microsatellite markers and

on the genetic diversity in the allergen genes fra a 1 and fra a 3." *Genetic resources crop evolution* **63**(7): 1203-1217.

Kang, C., O. Darwish, A. Geretz, R. Shahan, N. Alkharouf and Z. Liu (2013). "Genome-scale transcriptomic insights into early-stage fruit development in woodland strawberry *Fragaria vesca*." *The Plant Cell* **25**(6): 1960-1978.

Karlsson, A.-L., R. Alm, B. Ekstrand, S. Fjelkner-Modig, Å. Schiött, U. Bengtsson, L. Björk, K. Hjernø, P. Roepstorff and C. Emanuelsson (2004). "Bet v 1 homologues in strawberry identified as IgE-binding proteins and presumptive allergens." *Allergy* **59**(12): 1277-1284.

Katelaris, C. H. (2010). "Food allergy and oral allergy or pollen-food syndrome." *Current opinion in allergy clinical immunology* **10**(3): 246-251.

Katsiarimpa, A., F. Anzenberger, N. Schlager, S. Neubert, M.-T. Hauser, C. Schwedheimer and E. Isono (2011). "The Arabidopsis deubiquitinating enzyme AMSH3 interacts with ESCRT-III subunits and regulates their localization." *The Plant Cell* **23**(8): 3026-3040.

Kaul, S., D. Lüttkopf, B. Kastner, L. Vogel, G. Hölz, S. Vieths and A. Hoffmann (2007). "Mediator release assays based on human or murine immunoglobulin E in allergen standardization." *Clinical Experimental Allergy* **37**(1): 141-150.

Kay, A. B. (2001). "Allergy and allergic diseases." *New England Journal of Medicine* **344**(1): 30-37.

Klingler, J. P., G. Batelli and J.-K. Zhu (2010). "ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling." *Journal of experimental botany* **61**(12): 3199-3210.

Knezevic, J., A. Langer, P. A. Hampel, W. Kaiser, R. Strasser and U. Rant (2012). "Quantitation of affinity, avidity, and binding kinetics of protein analytes with a dynamically switchable biosurface." *Journal of the American Chemical Society* **134**(37): 15225-15228.

Kofler, S., C. Asam, U. Eckhard, M. Wallner, F. Ferreira and H. Brandstetter (2012). "Crystallographically mapped ligand binding differs in high and low IgE binding isoforms of birch pollen allergen bet v 1." *Journal of molecular biology* **422**(1): 109-123.

Koistinen, K. M., P. Soininen, T. A. Venäläinen, J. Häyrinen, R. Laatikainen, M. Peräkylä, A. I. Tervahauta and S. O. Kärenlampi (2005). "Birch PR-10c interacts with several biologically important ligands." *Phytochemistry* **66**(21): 2524-2533.

Kreft, D., R. Bauer and R. Goerlich (2013). *Nahrungsmittelallergene: Charakteristika und Wirkungsweisen*, Walter de Gruyter.

Kuckuck, H. (1980). "Elisabeth Schiemann 1881 bis 1972." *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **93**(1): 517-537.

Kurze, E., V. Kock, R. Lo Scalzo, K. Olbricht and W. Schwab (2018). "Effect of the Strawberry Genotype, Cultivation and Processing on the Fra a 1 Allergen Content." *Nutrients* **10**(7): 857.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680.

Laffer, S., S. Hamdi, C. Lupinek, W. R. Sperr, P. Valent, P. Verdino, W. Keller, M. Grote, K. Hoffmann-Sommergruber and O. Scheiner (2003). "Molecular characterization of recombinant T1, a non-allergenic periwinkle (*Catharanthus roseus*) protein, with sequence similarity to the Bet v 1 plant allergen family." *Biochemical Journal* **373**(1): 261-269.

Laimer, M. and F. Maghuly (2010). "Awareness and knowledge of allergens: A need and a challenge to assure a safe and healthy consumption of small fruits." *Journal of Berry Research* **1**(2): 61-71.

Langer, A., P. A. Hampel, W. Kaiser, J. Knezevic, T. Welte, V. Villa, M. Maruyama, M. Svejda, S. Jähner and F. Fischer (2013). "Protein analysis by time-resolved measurements with an electro-switchable DNA chip." *Nature communications* **4**: 2099.

Latrasse (1991). "Fruits III. In: Maarse H (Ed) *Volatile Compounds in Foods and Beverages*." Marcel Dekker Publishing, New York, USA: 329-387.

Lattanzio, V., V. M. Lattanzio and A. Cardinali (2006). "Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects." *Phytochemistry: Advances in research* **66**(2): 23-67.

Lebel, S., P. Schellenbaum, B. Walter and P. Maillot (2010). "Characterisation of the *Vitis vinifera* PR10 multigene family." *BMC plant biology* **10**(1): 184.

- Li, Z.-H., Q. Wang, X. Ruan, C.-D. Pan and D.-A. Jiang (2010). "Phenolics and plant allelopathy." *Molecules* **15**(12): 8933-8952.
- Liao, Z., M. Chen, L. Guo, Y. Gong, F. Tang, X. Sun and K. Tang (2004). "Rapid isolation of high-quality total RNA from *Taxus* and *Ginkgo*." *Preparative biochemistry biotechnology* **34**(3): 209-214.
- Lieberei, R., W. Franke and C. Reisdorff (2007). *Nutzpflanzenkunde: 118 Tabellen*, Georg Thieme Verlag.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Macher, B. A. and U. Galili (2008). "The Gal α 1, 3Gal β 1, 4GlcNAc-R (α -Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance." *Biochimica et Biophysica Acta -General Subjects* **1780**(2): 75-88.
- Maier, R. H., C. J. Maier, H. Hintner, J. W. Bauer and K. Önder (2012). "Quantitative real-time PCR as a sensitive protein-protein interaction quantification method and a partial solution for non-accessible autoactivator and false-negative molecule analysis in the yeast two-hybrid system." *Methods* **58**(4): 376-384.
- Manning, K. (1998). "Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits." *Planta* **205**(4): 622-631.
- Marković-Housley, Z., M. Degano, D. Lamba, E. von Roepenack-Lahaye, S. Clemens, M. Susani, F. Ferreira, O. Scheiner and H. Breiteneder (2003). "Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier." *Journal of molecular biology* **325**(1): 123-133.
- Marzban, G., F. Maghuly, A. Herndl, H. Katinger and M. Laimer (2008). "Screening and identification of putative allergens in berry fruits of the Rosaceae family: technical challenges." *Biofactors* **34**(1): 37-46.
- Marzban, G., H. Puehringer, R. Dey, S. Brynda, Y. Ma, A. Martinelli, M. Zaccarini, E. van der Weg, Z. Housley and D. Kolarich (2005). "Localisation and distribution of the major allergens in apple fruits." *Plant Science* **169**(2): 387-394.
- Mazzoni, L., P. Perez-Lopez, F. Giampieri, J. M. Alvarez-Suarez, M. Gasparrini, T. Y. Forbes-Hernandez, J. L. Quiles, B. Mezzetti and M. Battino (2016). "The genetic aspects of berries: from field to health." *Journal of the Science of Food Agriculture* **96**(2): 365-371.
- Medina-Puche, L., G. Cumplido-Laso, F. Amil-Ruiz, T. Hoffmann, L. Ring, A. Rodríguez-Franco, J. L. Caballero, W. Schwab, J. Muñoz-Blanco and R. Blanco-Portales (2013). "MYB10 plays a major role in the regulation of flavonoid/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria* × *Ananassa* fruits." *Journal of Experimental Botany* **65**(2): 401-417.
- Mirza, O., A. Henriksen, H. Ipsen, J. N. Larsen, M. Wissenbach, M. D. Spangfort and M. Gajhede (2000). "Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1." *The Journal of Immunology* **165**(1): 331-338.
- Mogensen, J. E., M. Ferreras, R. Wimmer, S. V. Petersen, J. J. Enghild and D. E. Otzen (2007). "The major allergen from birch tree pollen, Bet v 1, binds and permeabilizes membranes." *Biochemistry* **46**(11): 3356-3365.
- Mogensen, J. E., R. Wimmer, J. N. Larsen, M. D. Spangfort and D. E. Otzen (2002). "The major birch allergen, Bet v 1, shows affinity for a broad spectrum of physiological ligands." *Journal of Biological Chemistry* **277**(26): 23684-23692.
- Mulhardt, C. (2010). *Molecular biology and genomics*, Elsevier.
- Muñoz, C., T. Hoffmann, N. M. Escobar, F. Ludemann, M. A. Botella, V. Valpuesta and W. Schwab (2010). "The strawberry fruit Fra a allergen functions in flavonoid biosynthesis." *Molecular plant* **3**(1): 113-124.
- Murzin, A. G., S. E. Brenner, T. Hubbard and C. Chothia (1995). "SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures." *Journal of molecular biology* **247**(4): 536-540.

- Musidlowska-Persson, A., R. Alm and C. Emanuelsson (2007). "Cloning and sequencing of the Bet v 1-homologous allergen Fra a 1 in strawberry (*Fragaria ananassa*) shows the presence of an intron and little variability in amino acid sequence." *Molecular immunology* **44**(6): 1245-1252.
- Neudecker, P., K. Lehmann, J. Nerkamp, T. Haase, A. Wangorsch, K. Fötisch, S. Hoffmann, P. Rösch, S. Vieths and S. Scheurer (2003). "Mutational epitope analysis of Pru av 1 and Api g 1, the major allergens of cherry (*Prunus avium*) and celery (*Apium graveolens*): correlating IgE reactivity with three-dimensional structure." *Biochemical Journal* **376**(1): 97-107.
- Neudecker, P., K. Schweimer, J. Nerkamp, S. Scheurer, S. Vieths, H. Sticht and P. Rösch (2001). "Allergic cross-reactivity made visible solution structure of the major cherry allergen Pru av 1." *Journal of Biological Chemistry* **276**(25): 22756-22763.
- Noguchi, Y., T. Mochizuki and K. Sone (1997). "Interspecific Hybrids Originated from Crossing Asian Wild Strawberries (*Fragaria nilgerrensis* and *F. iinumae*) to *F. xananassa*." *J HortScience* **32**(3): 438-439.
- Pereira, D., P. Valentão, J. Pereira and P. Andrade (2009). Phenolics: From chemistry to biology, Molecular Diversity Preservation International.
- Perkins-Veazie, P. (1995). "Growth and ripening of strawberry fruit." *Horticultural reviews* **17**: 267-297.
- Pirquet, C. v. (1906). "Allergic Münch, med." *Wschr* **53**: 1457.
- Pourcel, L., N. G. Irani, Y. Lu, K. Riedl, S. Schwartz and E. Grotewold (2010). "The formation of anthocyanic vacuolar inclusions in *Arabidopsis thaliana* and implications for the sequestration of anthocyanin pigments." *Molecular plant* **3**(1): 78-90.
- Poustka, F., N. G. Irani, A. Feller, Y. Lu, L. Pourcel, K. Frame and E. Grotewold (2007). "A trafficking pathway for anthocyanins overlaps with the endoplasmic reticulum-to-vacuole protein-sorting route in *Arabidopsis* and contributes to the formation of vacuolar inclusions." *Plant physiology* **145**(4): 1323-1335.
- Puehringer, H. M., I. Zinoecker, G. Marzban, H. Katinger and M. Laimer (2003). "MdAP, a novel protein in apple, is associated with the major allergen Mal d 1." *Gene* **321**: 173-183.
- Radauer, C. and H. Breiteneder (2007). "Evolutionary biology of plant food allergens." *Journal of Allergy Clinical Immunology* **120**(3): 518-525.
- Radauer, C., P. Lackner and H. Breiteneder (2008). "The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands." *BMC evolutionary biology* **8**(1): 286.
- Raghavendra, A. S., V. K. Gonugunta, A. Christmann and E. Grill (2010). "ABA perception and signalling." *Trends in plant science* **15**(7): 395-401.
- Renz, H., A. Kaminski and P. I. Pfefferle (2008). "Allergieforschung in Deutschland." Ein Atlas mit Bestandsaufnahme, Defizit-und Bedarfsanalyse. Marburg: DGAKI Verlag.
- Rodriguez, J., J. F. Crespo, A. Lopez-Rubio, J. de la Cruz-Bertolo, P. Ferrando-Vivas, R. Vives and P. Daroca (2000). "Clinical cross-reactivity among foods of the Rosaceae family." *Journal of Allergy Clinical Immunology* **106**(1): 183-189.
- Rost, B., G. Yachdav and J. Liu (2004). "The predictprotein server." *Nucleic acids research* **32**(suppl_2): W321-W326.
- Rousseau-Gueutin, M., A. Gaston, A. Aïnouche, M. L. Aïnouche, K. Olbricht, G. Staudt, L. Richard and B. Denoyes-Rothan (2009). "Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria L.*(strawberry): new insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes." *Molecular Phylogenetics Evolution* **51**(3): 515-530.
- Rouvinen, J., J. Jänis, M.-L. Laukkanen, S. Jylhä, M. Niemi, T. Päivinen, S. Mäkinen-Kiljunen, T. Haahtela, H. Söderlund and K. Takkinen (2010). "Transient dimers of allergens." *PLoS One* **5**(2): e9037.
- Sainte-Laudy, J., A. Sabbah, M. Drouet, M. Lauret and M. Loiry (2000). "Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release." *Clinical experimental allergy: journal of the British Society for Allergy Clinical Immunology* **30**(8): 1166-1171.
- Salvatierra, A., P. Pimentel, M. A. Moya-Leon, P. D. Caligari and R. Herrera (2010). "Comparison of transcriptional profiles of flavonoid genes and anthocyanin contents during fruit development of two botanical forms of *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*." *Phytochemistry* **71**(16): 1839-1847.

- Santiago, J., F. Dupeux, K. Betz, R. Antoni, M. Gonzalez-Guzman, L. Rodriguez, J. A. Márquez and P. L. Rodriguez (2012). "Structural insights into PYR/PYL/RCAR ABA receptors and PP2Cs." *Plant Science* **182**: 3-11.
- Santiago, J., A. Rodrigues, A. Saez, S. Rubio, R. Antoni, F. Dupeux, S. Y. Park, J. A. Márquez, S. R. Cutler and P. L. Rodriguez (2009). "Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs." *The Plant Journal* **60**(4): 575-588.
- Saraste, M., P. R. Sibbald and A. Wittinghofer (1990). "The P-loop—a common motif in ATP-and GTP-binding proteins." *Trends in biochemical sciences* **15**(11): 430-434.
- Saud, G., F. Carbone, G. Perrotta, C. R. Figueroa, M. Moya, R. Herrera, J. B. Retamales, B. Carrasco, J. Cheel and G. Schmeda-Hirschmann (2009). "Transcript profiling suggests transcriptional repression of the flavonoid pathway in the white-fruited Chilean strawberry, *Fragaria chiloensis* (L.) Mill." *Genetic resources crop evolution* **56**(7): 895.
- Scalzo, J., A. Politi, N. Pellegrini, B. Mezzetti and M. Battino (2005). "Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit." *Nutrition* **21**(2): 207-213.
- Schirmer, T., K. Hoffmann-Sommergrube, M. Susani, H. Breiteneder and Z. Marković-Housley (2005). "Crystal structure of the major celery allergen Api g 1: molecular analysis of cross-reactivity." *Journal of molecular biology* **351**(5): 1101-1109.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband and K. W. Eliceiri (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." *Nature methods* **9**(7): 671-675.
- Schober, W., B. Belloni, S. Lubitz, B. Eberlein-König, P. Bohn, Y. c. Saritas, J. Lintelmann, G. Matuschek, H. Behrendt and J. Buters (2006). "Organic Extracts of Urban Aerosol (\leq PM_{2.5}) Enhance rBet v 1-Induced Upregulation of CD63 in Basophils from Birch Pollen-Allergic Individuals." *Toxicological Sciences* **90**(2): 377-384.
- Schütt, C. and B. Bröker (2011). *Grundwissen Immunologie*, Springer-Verlag.
- Searle, B. C. (2010). "Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies." *Proteomics* **10**(6): 1265-1269.
- Shpilka, T., H. Weidberg, S. Pietrokovski and Z. Elazar (2011). "Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family." *Genome biology* **12**(7): 226.
- Shulaev, V., D. J. Sargent, R. N. Crowhurst, T. C. Mockler, O. Folkerts, A. L. Delcher, P. Jaiswal, K. Mockaitis, A. Liston, S. P. Mane, P. Burns, T. M. Davis, J. P. Slovin, N. Bassil, R. P. Hellens, C. Evans, T. Harkins, C. Kodira, B. Desany, O. R. Crasta, R. V. Jensen, A. C. Allan, T. P. Michael, J. C. Setubal, J. M. Celton, D. J. Rees, K. P. Williams, S. H. Holt, J. J. Ruiz Rojas, M. Chatterjee, B. Liu, H. Silva, L. Meisel, A. Adato, S. A. Filichkin, M. Troggio, R. Viola, T. L. Ashman, H. Wang, P. Dharmawardhana, J. Elser, R. Raja, H. D. Priest, D. W. Bryant, Jr., S. E. Fox, S. A. Givan, L. J. Wilhelm, S. Naithani, A. Christoffels, D. Y. Salama, J. Carter, E. Lopez Girona, A. Zdepski, W. Wang, R. A. Kerstetter, W. Schwab, S. S. Korban, J. Davik, A. Monfort, B. Denoyes-Rothan, P. Arus, R. Mittler, B. Flinn, A. Aharoni, J. L. Bennetzen, S. L. Salzberg, A. W. Dickerman, R. Velasco, M. Borodovsky, R. E. Veilleux and K. M. Folta (2011). "The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*)." *Nat Genet* **43**(2): 109-116.
- Slovin, J. and T. Michael (2011). *Strawberry Part 3—structural and functional genomics. Genetics, genomics and breeding of berries*, Science Publishers, Enfield.
- Slovin, J. P., K. Schmitt and K. M. Folta (2009). "An inbred line of the diploid strawberry *Fragaria vesca* f. *semperflorens* for genomic and molecular genetic studies in the Rosaceae." *J Plant methods* **5**(1): 15.
- Somssich, I. E., E. Schmelzer, J. Bollmann and K. Hahlbrock (1986). "Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**(8): 2427-2430.
- Souci, S. W., W. Fachmann and H. Kraut (2000). *Food composition and nutrition tables*, Medpharm GmbH Scientific Publishers.
- Spangfort, M. D., O. Mirza, H. Ipsen, R. J. Van Neerven, M. Gajhede and J. N. Larsen (2003). "Dominating IgE-binding epitope of Bet v 1, the major allergen of birch pollen, characterized by X-ray crystallography and site-directed mutagenesis." *The Journal of Immunology* **171**(6): 3084-3090.

- Staudt, G. (1961). "Die Entstehung und Geschichte der großfrüchtigen Gartenerdbeeren *Fragaria × ananassa* Duch." *J TAG Theoretical Applied Genetics* **31**(5): 212-218.
- Staudt, G. (1988). The species of *Fragaria*, their taxonomy and geographical distribution. *International Strawberry Symposium* 265.
- Staudt, G. (1999). "Notes on Asiatic *Fragaria* species: *Fragaria nilgerrensis* Schltdl. ex J. Gay." *Bot. Jahrb. Syst.* **121**: 297-310.
- Strachan, D. P. (1989). "Hay fever, hygiene, and household size." *BMJ: British Medical Journal* **299**(6710): 1259.
- Swoboda, I., K. Hoffmann-Sommergruber, G. O'Ríordáin, O. Scheiner, E. Heberle-Bors and O. Vicente (1996). "Bet v 1 proteins, the major birch pollen allergens and members of a family of conserved pathogenesis-related proteins, show ribonuclease activity in vitro." *Physiologia Plantarum* **96**(3): 433-438.
- Szamos, J., K. Takacs, E. Szabo, E. Kovacs and E. Gelencser (2011). "Purification of natural Mal d 1 and Mal d 2 allergens and monitoring of their expression levels during ripening in Golden Delicious apple." *Food research international* **44**(9): 2674-2678.
- Taylor, A., L. Lever and C. Lawrence (1996). "Allergic contact dermatitis from strawberry lipsalve." *Contact dermatitis* **34**(2): 142-143.
- Team, R. C. (2014). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012, ISBN 3-900051-07-0.
- Tenessen, J. A., R. Govindarajulu, T.-L. Ashman and A. Liston (2014). "Evolutionary origins and dynamics of octoploid strawberry subgenomes revealed by dense targeted capture linkage maps." *Genome biology and evolution* **6**(12): 3295-3313.
- Trautmann, A., F. Heuck, R. Denfeld, P. Ruther and O. Paul (2006). Detachable silicon microneedle stamps for allergy skin prick testing. 19th IEEE international conference on micro electro mechanical systems, IEEE.
- Tsujishita, Y. and J. H. Hurley (2000). "Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain." *Nature Structural Molecular Biology* **7**(5): 408.
- Ulrich, D., E. Hoberg, A. Rapp and S. Kecke (1997). "Analysis of strawberry flavour–discrimination of aroma types by quantification of volatile compounds." *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A* **205**(3): 218-223.
- Ulrich, D., D. Komes, K. Olbricht and E. Hoberg (2007). "Diversity of aroma patterns in wild and cultivated *Fragaria* accessions." *J Genetic Resources Crop Evolution* **54**(6): 1185.
- Ulrich, D. and K. Olbricht (2013). "Diversity of volatile patterns in sixteen *Fragaria vesca* L. accessions in comparison to cultivars of *Fragaria × ananassa*." *Journal of Applied Botany Food Quality* **86**(1).
- Urrutia, M., W. Schwab, T. Hoffmann and A. Monfort (2016). "Genetic dissection of the (poly) phenol profile of diploid strawberry (*Fragaria vesca*) fruits using a NIL collection." *Plant Science* **242**: 151-168.
- Valent, P., A. W. Hauswirth, S. Natter, W. R. Sperr, H.-J. Bühring and R. Valenta (2004). "Assays for measuring in vitro basophil activation induced by recombinant allergens." *Methods* **32**(3): 265-270.
- Van Loon, L. C., M. Rep and C. M. Pieterse (2006). "Significance of inducible defense-related proteins in infected plants." *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**: 135-162.
- Van Neerven, R., E. Knol, A. Eijraes and P. Würtzen (2006). "IgE-mediated allergen presentation and blocking antibodies: regulation of T-cell activation in allergy." *International archives of allergy immunology* **141**(2): 119-129.
- Vanekreibitz, M., K. Hoffmannsommergruber, M. Machado, M. Susani, C. Ebner, D. Kraft, O. Scheiner and H. Breiteneder (1995). "Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen." *Biochemical biophysical research communications* **214**(2): 538-551.
- Ververidis, F., E. Trantas, C. Douglas, G. Vollmer, G. Kretzschmar and N. Panopoulos (2007). "Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health." *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology* **2**(10): 1214-1234.

- Vieths, S., S. Scheurer and B. Ballmer-Weber (2002). "Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen." *Annals of the New York Academy of Sciences* **964**(1): 47-68.
- Von Loetzen, C. S., T. Hoffmann, M. J. Hartl, K. Schweimer, W. Schwab, P. Rösch and O. Hartl-Spiegelhauer (2014). "Secret of the major birch pollen allergen Bet v 1: identification of the physiological ligand." *Biochemical Journal* **457**(3): 379-390.
- Von Loetzen, C. S., K. Schweimer, W. Schwab, P. Rösch and O. Hartl-Spiegelhauer (2012). "Solution structure of the strawberry allergen Fra a 1." *Bioscience reports* **32**(6): 567-575.
- Von Pirquet, C. (1907). "Tuberkulindiagnose durch cutane Impfung." *Berliner klinische Wochenschrift* **44**: 644-645.
- Walter, M. H., J.-W. Liu, C. Grand, C. J. Lamb and D. Hess (1990). "Bean pathogenesis-related (PR) proteins deduced from elicitor-induced transcripts are members of a ubiquitous new class of conserved PR proteins including pollen allergens." *Molecular General Genetics MGG* **222**(2-3): 353-360.
- Wang, H., G. Cao and R. L. Prior (1996). "Total antioxidant capacity of fruits." *Journal of agricultural food chemistry* **44**(3): 701-705.
- Warner, S. A., R. Scott and J. Draper (1992). "Characterisation of a wound-induced transcript from the monocot asparagus that shares similarity with a class of intracellular pathogenesis-related (PR) proteins." *Plant molecular biology* **19**(4): 555-561.
- Weltfriend, S., C. Kwangstuth and H. Maibach (1995). "Contact urticaria from cucumber pickle and strawberry." *Contact Dermatitis* **32**(3): 173-174.
- Wilson, D., R. Pethica, Y. Zhou, C. Talbot, C. Vogel, M. Madera, C. Chothia and J. Gough (2008). "SUPERFAMILY—sophisticated comparative genomics, data mining, visualization and phylogeny." *Nucleic acids research* **37**(suppl_1): D380-D386.
- Winkel-Shirley, B. (2002). "Biosynthesis of flavonoids and effects of stress." *Current opinion in plant biology* **5**(3): 218-223.
- Woo, J., E. Park and S. Dinesh-Kumar (2014). "Differential processing of Arabidopsis ubiquitin-like Atg8 autophagy proteins by Atg4 cysteine proteases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**(2): 863-868.
- Worseck, J. M., A. Grossmann, M. Weimann, A. Hegele and U. Stelzl (2012). A stringent yeast two-hybrid matrix screening approach for protein–protein interaction discovery. *Two Hybrid Technologies*, Springer: 63-87.
- Wu, F., Y. Li, S. Chang, Z. Zhou, F. Wang, X. Song, Y. Lin and W. Gong (2002). "Purification, characterization and preliminary crystallographic studies of a PR-10 protein from *Pachyrrhizus erosus* seeds." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **58**(12): 2165-2167.
- Yamamoto, M., S. Torikai and K. Oeda (1997). "A major root protein of carrots with high homology to intracellular pathogenesis-related (PR) proteins and pollen allergens." *Plant cell physiology* **38**(9): 1080-1086.
- Yan, Q., X. Qi, Z. Jiang, S. Yang and L. Han (2008). "Characterization of a pathogenesis-related class 10 protein (PR-10) from *Astragalus mongholicus* with ribonuclease activity." *Plant Physiology Biochemistry* **46**(1): 93-99.
- Yin, P., H. Fan, Q. Hao, X. Yuan, D. Wu, Y. Pang, C. Yan, W. Li, J. Wang and N. Yan (2009). "Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins." *Nature structural molecular biology* **16**(12): 1230.
- Zabetakis, I. and M. A. Holden (1997). "Strawberry flavour: analysis and biosynthesis." *Journal of the Science of Food Agriculture* **74**(4): 421-434.
- Zhang, J., X. Wang, O. Yu, J. Tang, X. Gu, X. Wan and C. Fang (2010). "Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) during fruit development and maturation." *Journal of experimental botany* **62**(3): 1103-1118.
- Zhang, Y., W. Li, Y. Dou, J. Zhang, G. Jiang, L. Miao, G. Han, Y. Liu, H. Li and Z. Zhang (2015). "Transcript quantification by RNA-Seq reveals differentially expressed genes in the red and yellow fruits of *Fragaria vesca*." *PloS one* **10**(12): e0144356.

Zhao, J., Y. Pang and R. A. Dixon (2010). "The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization." *Plant Physiology* **153**(2): 437-443.

Zifkin, M., A. Jin, J. A. Ozga, L. I. Zaharia, J. P. Scherthner, A. Gesell, S. R. Abrams, J. A. Kennedy and C. P. Constabel (2012). "Gene expression and metabolite profiling of developing highbush blueberry fruit indicates transcriptional regulation of flavonoid metabolism and activation of abscisic acid metabolism." *Plant Physiology* **158**(1): 200-224.

Zuberbier, T., G. Edenharter, M. Worm, I. Ehlers, S. Reimann, T. Hantke, C. Roehr, K. Bergmann and B. Niggemann (2004). "Prevalence of adverse reactions to food in Germany—a population study." *Allergy* **59**(3): 338-345.

Zubini, P., B. Zambelli, F. Musiani, S. Ciurli, P. Bertolini and E. Baraldi (2009). "The RNA hydrolysis and the cytokinin binding activities of PR-10 proteins are differently performed by two isoforms of the Pru p 1 peach major allergen and are possibly functionally related." *Plant physiology* **150**(3): 1235-1247.

Zuidmeer, L., E. Salentijn, M. F. Rivas, E. G. Mancebo, R. Asero, C. Matos, K. Pelgrom, L. Gilissen and R. Van Ree (2006). "The role of profilin and lipid transfer protein in strawberry allergy in the Mediterranean area." *Clinical Experimental Allergy* **36**(5): 666-675.